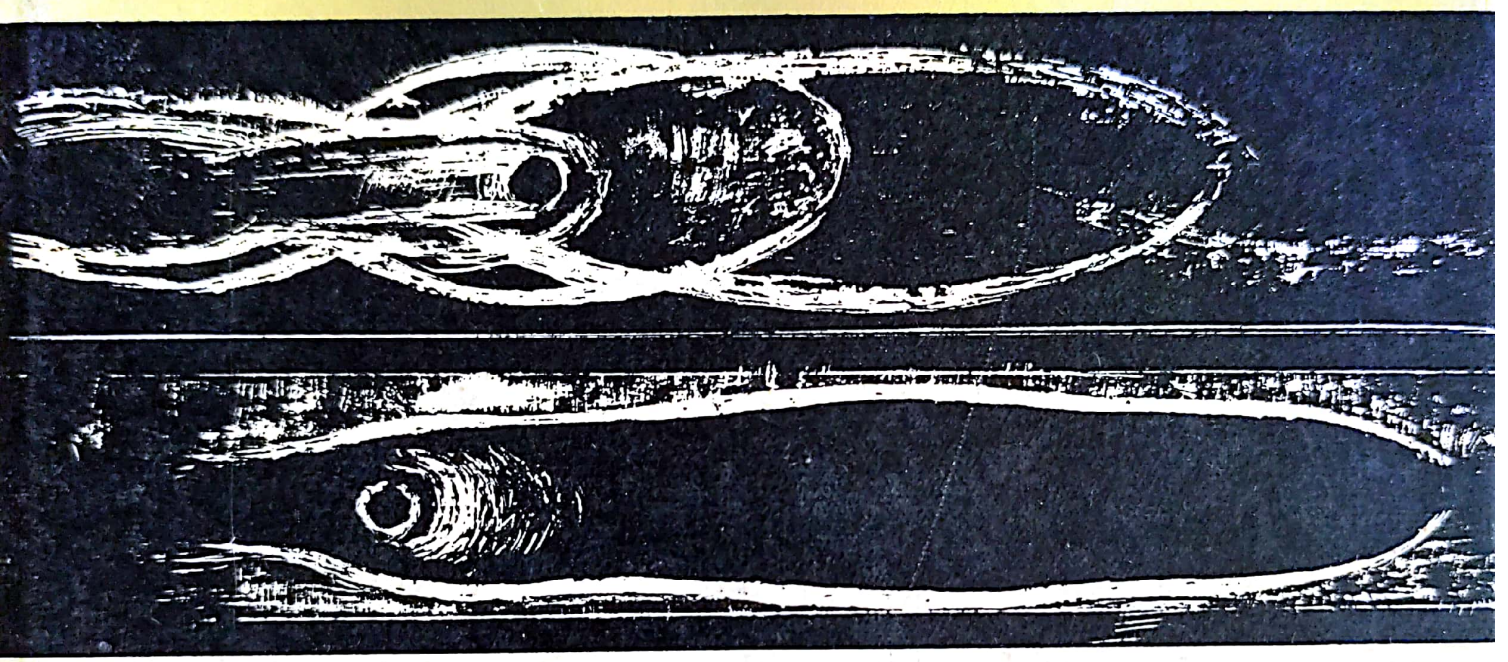
VICTOR GHEȚIE

VALERIU MICUȘAN



ANALIZA IMUNOCHIMICĂ

Lucrarea urmăreşte iniţierea cititorului în problemele fundamentale ale imunochimiei, expunîndu-se într-o succesiune logică şi o formă clară, cele mai generale probleme teoretice şi experimentale.

Structura lucrării scoate în evidenţă cele trei probleme de bază ale imunochimiei : antigenul, anticorpul şi reacţia antigen — anticorp. Numeroasele tabele, figuri şi indicaţii bibliografice uşurează folosirea materialului cuprins în lucrare, material în bună parte original, încă nepublicat în literatura de specialitate şi care izvorăşte dintr-o experienţă îndelungată a autorilor.

Tehnicile experimentale descrise sînt cele definitiv intrate în practica analizei imunochimiei. De aceea la selecţionarea lor s-au exclus tehnicile insuficient verificate, cele aplicate în cazuri particulare şi metodele la care experienţa autorilor a constatat o reproductibilitate sau o precizie nesatisfăcătoare. S-a făcut excepţie numai pentru acele metode, recent elaborate, care au perspectiva de a găsi o largă aplicare în imunochimie (de ex. cromatografia pe imunosorbenţi).

Prin tema abordată lucrarea va fi de un real folos unui larg cerc de specialişti din domeniul biochimiei, biologiei, medicinei umane şi veterinare, chimiei farmaceutice etc.

Scanned with OKEN Scanner

VICTOR GHEȚIE
VALERIU MICUȘAN

ANALIZA IMUNOCHIMICĂ

TEORIE ȘI PRACTICĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
BUCUREȘTI 1966

Scanned with OKEN Scanner

Prefață

Imunologia modernă cunoaște în zilele noastre o dezvoltare rapidă și multilaterală. Înțelegerea și aprofundarea faptelor care stau la baza reacțiilor imunologice fundamentale nu au putut fi realizate decît prin cercetarea aspectelor chimice ale imunității. Din această necesitate a apărut imunochimia, care a devenit, prin obiectivele ei, un capitol de sine stătător al chimiei biologice.

Știință încă tînără, în plină dezvoltare, imunochimia a obținut rezultate importante nu numai în domeniul imunologiei infecțioase sau neinfecțioase, ci și în multe alte domenii de cercetare biologică.

Din multitudinea problemelor rezolvate cu ajutorul imunochimiei s-au conturat metode și tehnici specifice de lucru. De aceea, apariția lucrării Analiza imunochimică *de* V. *Gheție și* V. *Micușan s-a impus ca o necesitate pentru sistematizarea acestora, fiind printre primele cărți din lume care au abordat acest aspect al imunochimiei.*

Autorii s-au consacrat imunochimiei, de aceea cartea de față este redactată cu competență și reprezintă o reușită și completă descriere a metodelor analizei imunochimice, expuse într-un mod original, izvorît din experiența și cercetările proprii ale autorilor.

Trebuie relevat faptul că autorii au conceput lucrarea ca un tot unitar. Structura cărții reflectă mersul normal al unei analize imunochimice complete, de la prepararea antigenului pînă la obținerea antiserului corespunzător, iar obligativitatea folosirii în analiza imunochimică a unor preparate de antigene și de anticorpi cît mai pure a determinat pe autori să acorde o deosebită atenție metodelor care duc la realizarea acestui important imperativ. Metodele și tehnicile expuse în lucrare au fost introduse numai după o prealabilă și critică verificare experimentală a lor, și, de aceea, în multe cazuri se fac precizări deosebit de folositoare în aplicarea lor practică. Pentru înțelegerea mai clară a diferitelor probleme expuse, autorii au introdus și un bogat material ilustrativ, reprezentînd realizări ale cercetătorilor din lumea întreagă alături de rezultatele lor proprii. Demn de reținut este și faptul că vasta bibliografie, care însoțește fiecare capitol al cărții, a fost cercetată cu

Scanned with OKEN Scanner

multă grijă de către autori, menționîndu-se numai lucrările cele mai utile și, pe cît posibil, cele care recurg la tehnici moderne de analiză.

Deși Analiza imunochimică *reprezintă o carte cu scop practic, autorii au depășit acest obiectiv, însoțind fiecare etapă de analiză cu o parte teoretică, care prezintă nivelul actual al cunoștințelor imunochimice în domeniul respectiv.*

Materialul util, pus la îndemîna cercetătorilor și tuturor celor interesați în probleme de imunochimie, prin apariția cărții, va constitui o bază temeinică în dezvoltarea ulterioară a acestei noi ramuri a chimiei biologice.

Acad. E. Macovschi

Scanned with OKEN Scanner

SUMAR

Pag.

Introducere 19

ANTIGENUL

I. Noţiuni teoretice 25

I. *Natura chimică a antigenelor* 25

II. *Condiţiile antigenicităţii* 26

III. *Specificitatea antigenelor* 27

IV. *Tipurile de specificitate imunologică* 28
1. Specificitatea de specie 28
2. Specificitatea de grup 28
3. Specificitatea de organ 29
4. Specificitatea funcţională 30

V. *Grupările determinante* 30

Bibliografie 32

II. Prepararea antigenelor 33

I. *Izolarea antigenelor* 35

1. Perfuzia 35
Perfuzia ficatului izolat de şobolan prin vena portă . . . 37
Perfuzia in situ a creierului de iepure 37
2. Ruperea membranei celulare 38
3. Extracţia 42

II. *Purificarea antigenelor* 47

1. Dializa şi electrodializa 49
2. Filtrarea prin gel 52
3. Cromatografia pe schimbători de ioni 60
4. Electroforeza preparativă 77
Electroforeza preparativă în bloc de amidon 77
Electroforeza preparativă în gel de agar sau agaroză . . 80
5. Precipitarea 81
Precipitarea cu săruri neutre (salifierea) 81
Precipitarea cu solvenţi organici 88

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

III. *Concentrarea antigenelor* 91

1. Perevaporarea 93
2. Îmbibarea gelurilor uscate 94
3. Concentrarea prin dializă şi ultrafiltrare 95
Dializa faţă de substanţe cu greutate moleculară mare 95
Ultrafiltrarea 97
4. Liofilizarea 99

Bibliografie 102

III. Controlul preparării antigenelor 107

I. *Puritatea antigenelor* 108

1. Testul solubilităţii 111
Metoda solubilităţii constante 111
Metoda precipitării fracţionate 113
2. Testul electroforetic 114
3. Testul cromatografic 117
4. Testul imunochimic 121
Testul supernatantului 121
Testul imunodifuziei 122

II. *Modificarea antigenelor în timpul prelucrării* 125

1. Controlul temperaturii 127
2. Controlul pH-ului 128
3. Selecţionarea substanţelor chimice întrebuinţate la preparare 129
4. Evitarea manipulărilor cu efect denaturant 129
5. Blocarea enzimelor proteolitice 130
6. Asigurarea sterilităţii preparatului 130

Bibliografie 131

IV. Determinarea cantitativă a antigenelor 133

I. *Antigene proteice* 134

1. Metoda Kjeldahl 135
2. Metoda biuretului 139
3. Metoda Lowry 140
4. Metoda absorbţiei în UV 142
5. Metoda legării coloranţilor 144
Metoda cu albastru de bromfenol 144
Metoda cu bromsulfoftaleină (BSP) 146

II. *Antigene polizaharidice* 148

1. Metode generale 150
Metoda cu orcinol pentru dozare globală 150
Metoda cu cisteină pentru identificarea componentelor . . 151
2. Metode specifice 152
Metoda Bial modificată pentru pentoze 152
Metoda cu antronă pentru hexoze 153
Metoda Elson-Morgan modificată pentru hexozamine . 154

Bibliografie 156

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

V. Noţiuni teoretice 159

I. *Structura anticorpilor* 159

II. *Eterogenitatea anticorpilor* 162

III. *Locul de formare a anticorpilor* 163

IV. *Hiperimunizarea şi dinamica formării anticorpilor* 165

V. *Factori care influenţează biosinteza anticorpilor* 167

1. Stimularea formării anticorpilor 168
2. Inhibarea formării anticorpilor 168
3. Paralizia imunologică 169

VI. *Mecanismul formării anticorpilor* 169

Bibliografie 170

VI. Prepararea antiserurilor 174

I. *Sterilizarea antigenelor* 175

1. Filtrarea 176
2. Adăugarea antibioticelor 177

II. *Asocierea adjuvanţilor* 178

1. Adjuvantul Freund 179
Compoziţie şi proprietăţi 179
Preparare 180
Mod de acţiune 180
Accidente 186
2. Gelul de aluminiu 188
Compoziţie şi proprietăţi 188
Preparare 188
Mod de acţiune 189

III. *Alegerea animalelor* 189

1. Reactivitatea imunologică a animalelor 190
2. Controlul animalelor 192
Determinarea stării de sănătate 192
Determinarea vîrstei 192
Determinarea sexului 192
3. Întreţinerea animalelor 194
Marcarea 194
Îngrijirea 194
Hrănirea 195
Bolile 195

IV. *Hiperimunizarea animalelor* 196

1. Inocularea antigenelor 196
Inocularea subcutanată 198
Inocularea intramusculară 199
Inocularea intraperitoneală 199
Inocularea intravenoasă 199
Inocularea intratesticulară 201

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

2. Condiţiile de hiperimunizare 201
Puritatea antigenului 201
Doza de antigen inoculată 202
Ritmul inoculărilor 203
Durata hiperimunizării 204
3. Scheme pentru hiperimunizare 206
4. Accidente la hiperimunizare 207

V. *Recoltarea sîngelui* 208

1. Contenţia animalelor şi dispozitivele uzuale de contenţie 209
2. Recoltarea cantităţilor mici de sînge 210
3. Exsanguinizarea 211
Puncţia cardiacă 211
Puncţia arterială 212

VI. *Păstrarea antiserurilor* 214

Bibliografie 215

VII. Izolarea şi caracterizarea anticorpilor 219

I. *Izolarea anticorpilor prin metode fizico-chimice (nespecifice)* . . . 221

1. Precipitarea 222
Precipitarea cu sulfat de amoniu 223
Precipitarea cu sulfat de sodiu 223
Precipitarea cu etanol 223
Precipitarea cu rivanol 224
2. Electroforeza preparativă 225
3. Filtrarea prin gel 226
4. Cromatografia pe schimbători de ioni 228

II. *Izolarea anticorpilor prin metode imunochimice (specifice)* 231

1. Etapele izolării anticorpilor 232
Formarea şi separarea complexului antigen-anticorp . . 233
Disocierea complexului antigen-anticorp 234
Separarea anticorpilor de antigene 239
2. Utilizarea imunosorbenţilor la izolarea anticorpilor . . . 241
Imunosorbenţi polistirenici 242
Imunosorbenţi celulozici 245
3. Absorbţia antiserurilor 251

III. *Fragmentarea anticorpilor* 255

1. Hidroliza enzimatică 255
2. Reducerea legăturilor disulfidice 258
3. Procedee experimentale 260
Hidroliza cu papaină a γG-globulinelor şi separarea fragmentelor obţinute 260
Hidroliza cu pepsină a γG-globulinelor şi separarea fragmentelor obţinute 262
Disocierea moleculelor de γG-globulină şi izolarea lanţurilor polipeptidice 263

Bibliografie 264

REACŢIA ANTIGEN-ANTICORP

VIII. Noţiuni teoretice 271

I. *Unirea antigenului cu anticorpul* 271

II. *Curbele de precipitare* 273

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

III. *Compoziția precipitatului imun* 274
IV. *Factori care influențează reacția de precipitare* 275

Bibliografie 277

IX. Imunoprecipitarea (Măsurarea concentrației anticorpilor) 279

I. *Metode semicantitative de dozare a anticorpilor* 280

1. Măsurarea titrului precipitant al antiserurilor prin metoda inelului 280
2. Determinarea raportului optim dintre antigen și anticorp prin metoda floculării (metoda Dean-Webb) 283

II. *Metode cantitative de dozare a anticorpilor* 285

1. Dozarea anticorpilor în precipitatul imun (metoda Heidelberger) 285
2. Dozarea anticorpilor prin fixare pe imunosorbenți (metoda Gurvici) 289
3. Echilibrul de dializă 292

Bibliografie 298

X. Imunodifuzia în gel 300

I. *Operații generale* 303

1. Prepararea gelului 303
   Purificarea agarului 303
   Prepararea agarozei 304
2. Montarea experiențelor 304
3. Examinarea și fotografierea plăcilor 306
4. Prelucrarea gelului după încheierea imunodifuziei . . 307
   Spălarea 308
   Uscarea și fixarea 308
   Colorarea 309
5. Utilizarea antiserurilor 311

II. *Dubla difuzie după Ouchterlony* 311

1. Metodologia 311
2. Forma și poziția liniilor de precipitare 312
3. Numărul liniilor de precipitare 313
   Linii de precipitare secundare (false) 814
4. Identificarea liniilor de precipitare 314
5. Sensibilitatea metodei 316
6. Determinarea cantitativă a antigenelor 317

III. *Imunoelectroforeza* 318

1. Metodologia 318
2. Tehnica electroforetică 320
3. Numărul și poziția liniilor de precipitare 324
4. Identificarea antigenelor 326
5. Identificarea anticorpilor 328
6. Rezoluție, sensibilitate și artefacte 328
7. Imunoelectroforegrama proteinelor din serul sanguin . . 330

Bibliografie 331

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

XI. Imunofluorescența 333

I. *Principiul metodei* 333

II. *Substanțe fluorescente utilizate la marcare* 335

1. Izocianații și izotiocianații 335
2. Clorurile de sulfonil 336

III. *Cuplarea anticorpilor cu substanțele fluorescente* 337

1. Cuplarea cu izotiocianați 337
2. Cuplarea cu sulfoclorurile 338
3. Proprietățile conjugatelor 338
4. Fluorocromarea directă a antiserurilor 339

IV. *Purificarea conjugatelor* 339

1. Metode de purificare 340
   Filtrarea prin gel de Sephadex 341
   Cromatografia pe DEAE-celuloză 341
   Absorbția cu pulbere de țesut 342

V. *Pregătirea materialului biologic* 343

1. Metode de obținere a secțiunilor 344
   Metoda secțiunilor înghețate 344
   Metoda secțiunilor incluse în parafină 345
2. Prelucrarea secțiunilor înaintea colorării 345
3. Greșeli în manipularea materialului biologic 346

VI. *Tehnica colorării cu anticorpi fluorescenți* 346

1. Colorarea directă 347
2. Colorarea indirectă aplicată la detectarea antigenelor . . 348
3. Colorarea indirectă aplicată la detectarea anticorpilor . . 349
4. Sensibilitatea metodelor de colorare 350

VII. *Examinarea preparatelor în ultraviolet* 350

1. Microscopia cu fluorescență 350
2. Tehnica examinării preparatului 353

Bibliografie 355

Anexa I. Extracția antigenelor din formațiunile intracelulare . 357

Anexa II. Prepararea membranelor semipermeabile 359

Anexa III. Nomograme pentru prepararea tampoanelor acetat și fosfat 359

Anexa IV. Prepararea p-aminobenzoilcelulozei 361

Anexa V. Prepararea pulberei de țesut uscată cu acetonă . . . 362

INDEX 363

Scanned with OKEN Scanner

SUMMARY

Page

Introduction 19

THE ANTIGEN

I. Theoretical concepts 25

I. *The chemical nature of the antigens* 25

II. *The conditions of antigenicity* 26

III. *Antigen specificity* 27

IV. *Types of immunologic specificity* 28

1. Species specificity 28
2. Group specificity 28
3. Organ specificity 29
4. Functional specificity 30

V. *Antigenic determinants* 30

References 32

II. Preparation of antigens 33

I. *Antigen isolation* 33

1. Perfusion 35
   Perfusion of isolated rat liver through portal vein . . 37
   Perfusion in situ of rabbit brain 37
2. Desintegration of cellular membrane 38
3. Extraction 42

II. *Antigen purification* 47

1. Dialysis and electrodialysis 49
2. Gel filtration 52
3. Chromatography on ion-exchangers 60
4. Preparative electrophoresis 77
   Preparative electrophoresis in starch block 77
   Preparative electrophoresis in agar or agarose gel . . 80

Scanned with OKEN Scanner

Page

5. Precipitation 81
Precipitation with neutre salts (salting-out) 81
Precipitation with organic solvents 88

III. *Antigen concentration* 91

1. Perevaporation 93
2. Imbibition of dry gels 94
3. Concentration by dialysis and ultrafiltration 95
Dialysis against substances with great molecular weight 95
Ultrafiltration 97
4. Freeze-drying 99

References 102

III. Control of antigen preparation 107

I. *Antigen purity* 108

1. Solubility test 111
The method of constant solubility 111
The method of fractionated precipitation 113
2. The electrophoretic test 114
3. The chromatographic test 117
4. The immunochemical test 121
The supernatant test 121
The immunodiffusion test 122

II. *Antigen modifications during processing* 125

1. Temperature control 127
2. pH control 128
3. Selecting of chemical substances used in preparation . 129
4. Avoiding of manipulations with denaturating effect . . 129
5. Blocking of proteolytic enzymes 130
6. Ensuring of product sterility 130

References 131

IV. Quantitative determination of antigens 133

I. *Protein antigens* 134

1. Kjeldahl method 135
2. Biuret method 139
3. Lowry method 140
4. Method of absorption in UV 142
5. Method of dye binding 144
The bromphenol blue method 144
The BSP method 146

II. *Polysaccharide antigens* 148

1. General methods 150
The orcinol method for global dosage 150
The cystein method for component identification . . . 151
2. Specific methods 152
The Bial method adapted to pentoses 152
The method with anthrone for hexoses 153
The Elson-Morgan method adapted to hexoseamines . . 154

References 156

Scanned with OKEN Scanner

Page

V. Theoretical notions 159

I. *Structure of antibodies* 159

II. *Heterogeneity of antibodies* 161

III. *Place of antibody formation* 163

IV. *Hyperimmunization and the dynamics of antibody formation* . 164

V. *Factors influencing the biosynthesis of antibodies* 167

1. The stimulation of antibody formation 168
2. Inhibition of antibody formation 168
3. Immunologic paralysis 169

VI. *The mechanism of antibody formation* 169

References 170

VI. Preparation of antisera 174

I. *Antigen sterilization* 175

1. Filtration. 176
2. Adding of antibiotics 177

II. *Adjuvant association* 178

1. Freund's adjuvant 179
   Composition and properties 179
   Preparation 180
   Way of action 180
   Accidents 186
2. Aluminium gel 188
   Composition and properties 188
   Preparation 188
   Way of action 189

III. *Selecting of animals* 189

1. Immunologic reactivity of animals 190
2. Control of animals 192
   Determination of health 192
   Determination of age 192
   Determination of sex 192
3. Keeping of animals 194
   Marking 194
   Care-taking 194
   Feeding 195
   Diseases 195

IV. *Hyperimmunization of animals* 196

1. Inoculation of antigens 196
   Subcutaneous inoculation 198
   Intramuscular inoculation 199
   Intraperitoneal inoculation 199
   Intravenous inoculation 199
   Intratesticular inoculation 201

Scanned with OKEN Scanner

Page

2. The conditions of hyperimmunization 201
Antigen purity 201
Dose of inoculated antigen 202
Rate of inoculation 203
Duration of hyperimmunization 204
3. Schemes for hyperimmunization 206
4. Accidents at hyperimmunization 207

V. *Bleeding* 208
1. Animal contention and usual devices for contention . . 209
2. Small blood quantity bleeding 210
3. Exsanguination 211
Heart puncture 211
Arterial puncture 212

VI. *Preserving of antisera* 214

References 215

VII. Isolation and characterization of antibodies . . . 219

I. *Isolation of antibodies by (nonspecific) physico-chemical methods* . 221

1. Precipitation 222
Precipitation with ammonium sulfate 223
Precipitation with sodium sulfate 223
Precipitation with ethanol 223
Precipitation with rivanol 224
2. Preparative electrophoresis 225
3. Gel filtration 226
4. Ion-exchange chromatography 228

II. *Isolation of antibodies by (specific) immunochemical methods* . . 231

1. Steps of antibody isolation 232
Forming and separation of the antigen-antibody complex 233
Dissociation of the antigen-antibody complex 234
Separation of antibodies from antigen 239
2. The use of immunoadsorbents in antibody isolation . . . 241
Polystyrene immunoadsorbents 242
Cellulose immunoadsorbents 245
3. Absorption of antisera 251

III. *Cleavage of antibodies* 255

1. Enzymatic hydrolysis 255
2. Reduction of disulfide bonds 258
3. Experimental methods 260
Papain hydrolysis of γG-globulins and separation of obtained fragments 260
Pepsin hydrolysis of γG-globulins and separation of obtained fragments 262
Dissociation of γG-globulin molecules and isolation of polypeptidic chains 263

References 264

THE ANTIGEN-ANTIBODY REACTION

VIII. Theoretical concepts 271

I. *Antigen-antibody combination* 271

II. *Precipitation curves* 273

Scanned with OKEN Scanner

Page

III. *Composition of the immune precipitate* 274

IV. *Factors influencing the precipitation reaction* 275

References 277

X. Immunoprecipitation (Measurement of antibody concentration) 279

I. *Semiquantitative methods of antibody dosing* 280

1. Measurement of precipitant titre of antisera by the ring test 280
2. Determination of the optimum relation between antigen and antibody by means of the floculation test (Dean-Webb method) 283

II. *Quantitative methods of antibody dosing* 285

1. Antibody dosing in the immune precipitate (Heidelberger method) 285
2. Antibody dosing through fixing on immunoadsorbents (Gurvici method) 289
3. The dialysis equilibrium 292

References 298

X. Immunodiffusion in gel 300

I. *General operations* 303

1. Gel preparation 303
   Agar purification 303
   Preparation of agarose 304
2. Setting up of the experiences 304
3. Examination and photographing of the plates 306
4. Gel processing after cession of immunodiffusion 307
   Washing up 308
   Drying and fixing 308
   Staining 309
5. Use of antisera 311

II. *Ouchterlony double diffusion* 311

1. Methodology 311
2. The form and position of the precipitation arcs . . . 312
3. The number of the precipitation arcs 313
   Secondary precipitation arcs 314
4. Identification of precipitation arcs 314
5. Method sensitivity 316
6. Quantitative determination of antigens 317

III. *Immunoelectrophoresis* 318

1. Methodology 318
2. The electrophoretic technique 320
3. Number and position of precipitation arcs 324
4. Identification of antigens 326
5. Identification of antibodies. 328
6. Resolution, sensitivity and artefacts 328
7. Protein immunoelectrophoreogram of blood serum . . . 330

References 331

Scanned with OKEN Scanner

Page

XI. Immunofluorescence 333

I. *The principle of the method* 333

II. *Fluorescent substances used in marking* 335

1. Isocyanates and isothiocyanates 335
2. Sulfonyl chlorides 336

III. *Coupling of antibodies with fluorescent substances* 337

1. Coupling with isothiocyanates 337
2. Coupling with sulfonyl chlorides 338
3. The properties of the conjugates 338
4. Direct fluorochroming of antisera 339

IV. *Purification of the conjugates* 339

1. Methods of purification 340
   Sephadex-gel filtration 341
   Chromatography on DEAE-cellulose 341
   Absorption with tissue powder 342

V. *Preparation of the biological material* 343

1. Methods of section obtaining 344
   The method of frozen sections 344
   The method of paraffin-embedded sections 345
2. Processing of the sections before staining 345
3. Errors in manipulating the biological material 346

VI. *The technique of staining with fluorescent antibodies* 346

1. Direct staining 347
2. Indirect staining applied to antigen detection 348
3. Indirect staining applied to antibody detection 349
4. Sensitivity of the staining methods 350

VII. *Examining of product in ultraviolet* 350

1. Fluorescence microscopy 350
2. The technique of product examination 353

References 355

Annex I. *Antigen extraction of intracellular formations* 357

Annex II. *Preparation of semipermeable membranes* 359

Annex III. *Nomograms for acetate and phosphate buffer preparation* 359

Annex IV. *Preparation of p-aminobenzoylcellulose* 361

Annex V. *Preparation of acetone-dried tissue powder* 362

INDEX 363

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

IMUNOCHIMIA are ca obiect studiul substanţelor şi al proceselor chimice care determină sau participă la reacţiile imunologice. Un loc deosebit în cadrul acestei discipline îl ocupă chimia antigenelor şi a anticorpilor, precum şi interacţiunea dintre aceste componente.

Imunochimia este o disciplină independentă, avînd obiective proprii net delimitate de cele ale imunologiei. Atingerea obiectivelor se realizează prin metode specifice, elaborate în concordanţă cu particularităţile fenomenelor investigate. Bogăţia materialului experimental şi generalitatea concluziilor şi a legilor desprinse au contribuit din plin la individualizarea acestei discipline.

Metodele de cercetare folosite în imunochimie au rezultat din contopirea metodelor de investigaţie fizico-chimice cu cele imunologice. De aceea, ele au precizia metodelor fizico-chimice, armonios completate cu o înaltă sensibilitate şi specificitate, imprimate de caracterul imunologic al reacţiilor. Metodele imunochimice au apărut pe măsura dezvoltării analizei fizico-chimice şi în urma cunoaşterii factorilor chimici care intervin în reacţiile imunologice. Procesul de elaborare şi de perfecţionare a metodicii imunochimice continuă şi în prezent cu o mare amploare, existînd mari posibilităţi de a găsi şi aplica noi metode imunochimice.

Metodele imunochimice se aplică la abordarea şi rezolvarea problemelor teoretice şi practice pe care le ridică în permanenţă studiul chimic al proceselor imunologice. Ele au depăşit însă cadrul propriei lor discipline, fiind un mijloc de investigaţie care se aplică cu deosebit succes la studiul substanţelor proteice, al polizaharidelor şi al lipopolizaharidelor. Sfera de aplicare a acestor metode în diferite domenii ale biochimiei este în continuă lărgire, existînd premise ca metoda imunochimică să poată furniza date preţioase şi pentru studiul acizilor nucleici. Ea permite abordarea celor mai variate probleme de interes teoretic şi practic, dintre care amintim doar cîteva : locul şi căile de biosinteză a proteinelor, structura proteinelor şi a polizaharidelor, raportul dintre structura chimică şi activitatea biologică a enzimelor, hormonilor şi toxinelor, înrudirea sau diferenţierea dintre substanţe, celule, ţesuturi şi organe învestite cu activitate normală sau patologică antigenică, evidenţierea modificărilor la nivel molecular, controlul purităţii unui preparat, determinarea specifică a proteinelor şi a polizaharidelor în soluţii diluate, modificările pe care le suferă proteinele serice în cursul unor afecţiuni etc.

Metodele imunochimice au pătruns ca mijloc puternic de cercetare şi în alte domenii ale biologiei şi medicinii, ca : histologia, citologia, genetica,

Scanned with OKEN Scanner

embriologia şi, bineînţeles, microbiologia şi virusologia. Introducerea tehnicii imunochimice în aceste discipline a permis aprofundarea unor procese şi fenomene insuficient cunoscute sau caracterizate prin metodele specifice disciplinelor respective.

Metodele imunochimice sînt utilizate de un număr din ce în ce mai mare de cercetători la rezolvarea celor mai diferite probleme. Pregătirea lor de specialitate nu cuprinde, de multe ori, o instruire temeinică în domeniul imunochimiei teoretice şi experimentale, de aceea şi aplicarea mijloacelor de investigaţie nu se face întotdeauna cu suficientă competenţă. Corespunzător acestei situaţii, nici utilizarea metodelor imunochimice nu furnizează datele ştiinţifice scontate. De asemenea, multe cercetări se opresc la un anumit nivel de cunoaştere, deoarece autorii, lipsiţi de instrucţiune imunochimică, ezită să aplice o metodă insuficient de cunoscută la abordarea imprevizibilului experimental. Din aceste motive ne-am hotărît să elaborăm o lucrare în care să concentrăm atît tehnicile şi procedeele experimentale, cît şi modul de abordare a problemelor şi de interpretare a rezultatelor. Din numărul mare de tehnici folosite în imunochimia experimentală am înfăţişat numai pe cele mai generale, a căror aplicare şi eficienţă nu se limitează la imunochimie, ci se extinde şi la chimia proteinelor şi a polizaharidelor. De aceea, în *Analiza imunochimică* am cuprins numai metodele imunochimice bazate pe reacţia de precipitare a antigenului cu anticorpul. Cu celelalte metode, bazate pe aglutinare, liză sau reacţia anafilactică, se abordează mai mult probleme imunologice, extinderea lor în celelalte domenii fiind limitată.

Structura cărţii reflectă intenţia noastră de a prezenta materialul experimental şi teoretic în ordinea logică în care se parcurge în mod obişnuit o analiză imunochimică complexă a unui antigen oarecare. Acest mod de prezentare scoate în evidenţă cele două operaţii preliminare care fac posibilă analiza imunochimică : prepararea antigenelor şi obţinerea anticorpilor specifici. Potrivit vederilor noastre, analiza imunochimică nu se limitează la producerea şi la măsurarea reacţiei antigen-anticorp, ci cuprinde şi toate operaţiile prin care se obţin cei doi componenţi. Din acest motiv am considerat că omiterea sau numai prezentarea sumară a acestor operaţii, frecvent practicată în alte tratate, ar aduce prejudicii cercetătorilor nefamiliarizaţi cu tehnica analizelor fizico-chimice şi celor neobişnuiţi cu experimentul biologic pe animale.

Desfăşurarea unei analize imunochimice complete implică parcurgerea a trei etape principale : prepararea antigenului ; obţinerea anticorpilor specifici (antiserul) prin imunizarea animalelor cu materialul antigenic preparat ; producerea unei reacţii între anticorpii specifici şi antigenul corespunzător. Interpretarea reacţiei poate furniza date atît asupra antigenului, cît şi asupra anticorpilor.

Prima operaţie, esenţială pentru îndeplinirea cu succes a unei analize imunochimice, este obţinerea antigenului într-o formă pură şi într-o stare cît mai apropiată de cea nativă. Această sarcină nu poate fi îndeplinită fără aplicarea cu mult discernămînt a metodelor de izolare şi de purificare folosite în chimia proteinelor şi a polizaharidelor. Deoarece obţinerea

Scanned with OKEN Scanner

unui antigen alcătuit numai din molecule de acelaşi fel este un deziderat ideal, experimentatorul trebuie să stăpînească principalele mijloace pentru controlarea gradului de puritate a unui antigen. Aceste probleme complexe sînt cuprinse în partea I (*Antigenul*), în care se expun tehnicile generale de preparare a antigenelor, mijloacele de control a purităţii preparatelor şi metodele pentru determinarea lor cantitativă.

Aflat în posesia antigenului pur, experimentatorul trebuie să obţină reactivul biologic cu care se execută analiza imunochimică : antiserul. Acest reactiv specific se obţine prin injectarea animalelor de laborator cu materialul antigenic. Animalele răspund la aceste injecţii prin sinteza anticorpilor, prezenţa lor demonstrîndu-se în sînge.

Anticorpii sînt substanţe proteice destul de stabile; păstraţi în condiţii corespunzătoare pot fi întrebuinţaţi mai mult timp ca reactiv pentru studierea antigenului. În acest scop se pot utiliza antiseruri integrale sau numai anticorpi izolaţi din aceste antiseruri. Prepararea antiserurilor specifice, avînd anticorpi care reacţionează numai cu antigenul studiat, este o condiţie de bază pentru reuşita analizei imunochimice.

În partea a II-a (*Anticorpul*), este prezentat pe larg modul de preparare a antiserurilor şi sînt tratate, respectînd ordinea firească a unei analize imunochimice, hiperimunizarea animalelor de laborator, recoltarea şi păstrarea antiserurilor, izolarea, şi purificarea anticorpilor.

Partea a III-a a lucrării (*Reacţia antigen-anticorp*) cuprinde principalele metode imunochimice de analiză, care se bazează pe reacţia de imunoprecipitare: precipitarea în mediu lichid, precipitarea în mediu solid (difuzia simplă şi dublă, imunoelectroforeza) şi precipitarea în celule cu anticorpi fluorescenţi. Reacţia de imunoprecipitare permite atît disocierea caracterelor unui amestec complex, cît şi studiul particularităţilor structurale ale unui antigen pur. Aplicarea acestei reacţii este foarte largă. Este suficient să amintim că majoritatea materialului experimental asupra structurii antigenice a ţesuturilor normale şi patologice a fost cules cu ajutorul metodelor bazate pe reacţia de precipitare. Fiecare din metodele prezentate are cîte o indicaţie majoră, atît la studierea antigenelor, cît şi la studierea anticorpilor. Astfel, imunoprecipitarea în mediu lichid permite compararea caracterului antigenic global al diferitelor preparate biologice şi permite totodată determinarea concentraţiei anticorpilor în antiser. Prin imunoprecipitare în mediu solid se determină eterogenitatea antigenelor sau a anticorpilor, în timp ce prin metoda anticorpilor fluorescenţi se urmăreşte localizarea în celule a celor doi componenţi.

La sfîrşitul lucrării am concentrat într-o parte specială intitulată *Anexe*, reţetele pentru prepararea unor reactivi şi soluţii uzuale, precum şi materialele ajutătoare necesare aplicării corecte a metodelor experimentale descrise. Am extras aceste detalii din cuprinsul cărţii nu numai pentru a uşura găsirea şi folosirea lor la diferite experienţe, cît şi pentru a facilita parcurgerea materialului fundamental.

Scanned with OKEN Scanner

Fiecare parte a cărţii şi uneori chiar fiecare capitol consacrat unei probleme speciale posedă un material introductiv teoretic şi, la sfîrşit, un material experimental exemplificator.

Materialul teoretic redă problemele sub aspectul lor cel mai general, urmărind înzestrarea cititorului cu noţiunile fundamentale necesare aplicării analizei imunochimice în practica de laborator şi în cercetarea ştiinţifică. De aceea, la prezentarea cunoştinţelor de imunologie am evitat problemele controversate şi concepţiile insuficient fundamentate experimental. Din acelaşi motiv, la prezentarea fenomenelor fizico-chimice care stau la baza unor procedee descrise am redus partea matematică la strictul necesar, insistînd mai mult asupra înţelegerii fenomenelor sub aspectul lor fizic. Am procedat astfel din dorinţa de a prezenta întreaga analiză imunochimică într-o formă accesibilă tuturor categoriilor de cititori.

Aşa cum am arătat mai sus, în cuprinsul lucrării sînt descrise numai tehnicile experimentale, definitiv intrate în practica analizei imunochimice. De aceea, la selecţionarea lor am exclus tehnicile insuficient verificate, cele aplicate în cazuri particulare şi metodele la care experienţa noastră a constatat o reproductibilitate sau o precizie nesatisfăcătoare. Am făcut excepţie numai pentru acele metode, recent elaborate, care au perspectiva de a găsi o largă aplicare în imunochimie (de ex. cromatografia pe imunosorbenţi). Metodele şi manipulările recomandate au fost verificate de noi în laborator şi, în măsura posibilităţilor, am căutat să aducem unele precizări în folosirea lor.

La întocmirea acestei lucrări au contribuit în mare măsură condiţiile bune de lucru asigurate şi interesul constant manifestat de acad. E. Macovschi, directorul Institutului de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România şi de prof. dr. M. Mezincescu, şeful catedrei de biochimie I a Institutului de medicină şi farmacie din Bucureşti, cărora le mulţumim călduros şi pe această cale.

Mulţumim de asemenea colegilor: D. Moţet pentru lectura întregii lucrări şi pentru preţioasele observaţii făcute pe marginea ei, C. Şelaru pentru materialele nepublicate privind hidroliza enzimatică a anticorpilor, puse cu generozitate la dispoziţia noastră, C. Medeşan pentru sprijinul pe care ni l-a acordat la prezentarea problemelor care implică folosirea animalelor de laborator, N. St. Chişiu pentru imunoelectroforegramele puse la dispoziţia noastră şi pentru observaţiile preţioase privind capitolul de imunofluorescenţă.

Autorii sînt recunoscători pentru materialele puse la dispoziţie şi indicaţiile primite din partea: prof. dr. S. Cohen, prof. dr. A. Coons, dr. A. J. Crowle, prof. dr. H. F. Deutsch, prof. dr. D. Glick, prof. dr. P. Grabar, dr. L. A. Hansen, prof. dr. J. F. Heremans, dr. J. Killander, prof. dr. C. L. Markert, prof. dr. R. C. Mellors, prof. dr. R. C. Nairn, prof. dr. R. R. Porter, prof. dr. D. Pressman, ing. F. Skvaril, dr. H. A. Sober şi prof. dr. R. G. White.

Scanned with OKEN Scanner

Autorii rămîn îndatoraţi revistelor: „Annals of the New York Academy of Sciences", „Archives of Biochemistry and Biophysics", „The Journal of Experimental Medicine", „The Journal of Laboratory and Clinical Medicine", „International Archives of Allergy and Applied Immunology", cît şi editurilor Arscia-Bruxelles şi Masson et Cie-Paris pentru permisiunea de a reproduce unele materiale ilustrative apărute în paginile lor.

Exprimăm mulţumiri şi firmelor LKB — Stockholm, Pharmacia — Uppsala, Serva — Heidelberg, cît şi VEB Carl Zeiss — Jena, pentru materialele ilustrative şi permisiunea de a reproduce unele aparate cu aplicaţie în analiza imunochimică.

Autorii

Scanned with OKEN Scanner

ANTIGENUL

CAPITOLUL I NOŢIUNI TEORETICE

ANTIGEN se numeşte o substanţă învestită cu două proprietăţi fundamentale : introdusă în organismul unui animal determină apariţia în corpul acestuia a unor proteine specifice, denumite anticorpi ; pusă în contact cu aceşti anticorpi, dă naştere la o reacţie care poate fi pusă în evidenţă (precipitare, aglutinare, liză etc.).

Substanţele care posedă ambele aceste însuşiri sînt denumite antigene complete sau, pe scurt, antigene. Din această categorie fac parte majoritatea proteinelor şi unele polizaharide.

Substanţele care, cu toate că reacţionează cu anticorpii, nu pot determina formarea acestora sînt cunoscute sub numele de haptene sau semiantigene. Haptenele pot declanşa sinteza anticorpilor în animalele de experienţă numai dacă au fost combinate în prealabil cu un antigen complet (proteină). Din categoria haptenelor fac parte compuşi cu greutate moleculară mică, de natură glucidică şi lipidică şi o serie de substanţe chimice naturale sau artificiale.

Procesul de combinare a anticorpilor cu haptena lipsită de proteina care îi conferă antigenicitate nu este în general însoţit de precipitare, cu toate că în unele cazuri precipitarea poate avea loc. Serul imun tratat cu haptena corespunzătoare pierde însă capacitatea de a reacţiona cu antigenul proteic cuplat cu haptena. Această reacţie a primit denumirea de *reacţia de inhibiţie*.

Polizaharidele bacteriene se comportă în general ca haptene, provocînd formarea anticorpilor numai dacă sînt combinate chimic cu o proteină, ca în celula bacteriană. Spre deosebire de polizaharide, lipidele dobîndesc proprietăţi antigenice chiar prin simplă amestecare mecanică cu proteinele.

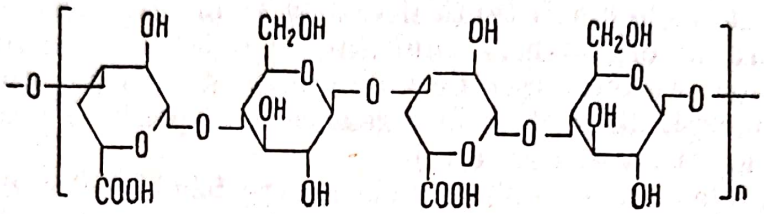
1. NATURA CHIMICĂ A ANTIGENELOR

Pînă nu de mult s-a considerat că toate antigenele sînt de natură proteică. Proteinele nu au o capacitate egală de a induce formarea anticorpilor. Astfel, gelatina, în condiţii obişnuite de imunizare, este lipsită de proprietăţi antigenice. Numai administrată în condiţii speciale, în amestec cu substanţe adjuvante, poate determina formarea unor anticorpi specifici (11) (12). Alte proteine ca : hemoglobina, histonele, protaminele şi prolaminele posedă proprietăţi antigenice slabe.

Scanned with OKEN Scanner

M. Heidelberger şi O. T. Avery (5) au arătat că prin injectarea polizaharidelor purificate, extrase din capsula pneumococului de tip III, se produc anticorpi specifici la şoarece şi om. Cercetări ulterioare au demonstrat că şi alte polizaharide ca: dextranii (7), levanii [1] (1), antigenul Vi din *E. coli* (3), antigenul O din salmonele (20) ş. a. sînt capabile de a induce formarea de anticorpi.

Dintre polizaharidele bacteriene, cel mai bine studiat este polizaharidul capsular al pneumococului de tip III. El este alcătuit din repetarea unei unităţi structurale denumită acid celobiuronic, avînd formula (48):



Polizaharidul pneumococic de tip VIII conţine de asemenea acid celobiuronic însă, în plus, mai conţine şi galactoză. Unitatea care se repetă este alcătuită din (6):

(—4—β—D—ac. glucuronic 1→4—β—D—glucoză 1→4—α—D—glucoză 1→4—α—D—galactoză 1→)$_n$

Injectarea animalelor cu cantităţi mici de polizaharide pneumococice exercită un efect protector faţă de infecţiile cu tipul corespunzător de pneumococ.

II. CONDIŢIILE ANTIGENICITĂŢII

Pentru ca o substanţă dată să fie antigenică trebuie să îndeplinească două condiţii:

a) Antigenul să fie străin pentru organismul animalului de experienţă. În condiţii normale, animalul nu produce anticorpi faţă de substanţele care se găsesc în corpul său. Astfel, un iepure va produce anticorpi prin injectarea proteinelor serice de cal, însă nu se vor obţine niciodată anticorpi prin injectarea proteinelor din propriul său sînge.

Proteinele care îndeplinesc funcţii biochimice similare, insulină, hemoglobină, au o structură chimică asemănătoare, chiar dacă provin de la specii diferite. Din acest motiv, aceste proteine au în general o antigenicitate slabă. În general, proteinele sînt cu atît mai antigenice cu cît provin din organisme mai îndepărtate din punct de vedere taxonomic de animalul de experienţă. Astfel, pentru iepure, hemocianina din sîngele

[1] Dextranii şi levanii sînt homopolizaharidele glucozei, respectiv fructozei, produse de bacterii.

nevertebratelor este un antigen puternic, în timp ce hemoglobina mamiferelor este slab antigenică.

b) antigenul trebuie să aibă un anumit minim de complexitate şi dimensiuni sub care molecula este lipsită de proprietăţi antigenice. Importanţa complexităţii moleculei pentru antigenicitate este sugerată de puterea antigenică slabă a unor proteine cu organizare moleculară relativ simplă (protamină, gelatină etc.) sau a unor polipeptide sintetice, constituite numai din cîteva tipuri de aminoacizi. Se pot obţine anticorpi chiar faţă de substanţe obţinute integral prin sinteză chimică. Astfel, polivinilpirolidona este antigenică pentru om (13), unele polipeptide sintetice pe bază de acid glutamic şi lizină sînt slab antigenice pentru iepuri, cobai şi om (14) (15) etc.

III. SPECIFICITATEA ANTIGENELOR

Un material injectat la un animal de experienţă provoacă apariţia unui sistem de anticorpi, a cărui eficacitate se limitează la materialul antigenic injectat. În acest sens, un ser imun (antiser) produs prin injectarea unei proteine unitare constituie un reactiv specific, exclusiv faţă de această proteină. Deci, serul imun va reacţiona dînd naştere unui precipitat numai cu proteina care a servit la imunizarea animalului (*antigen omolog*). Sînt şi unele excepţii, denumite *reacţii încrucişate*, în care anticorpii reacţionează şi cu alte substanţe în afara celei care a servit la imunizare (*antigen eterolog*). Este clar că reacţiile încrucişate se datoresc asemănărilor structurale dintre antigenele unitare [1].

Specificitatea antigenelor este determinată de particularităţile structurale ale moleculelor lor. După W. C. B o y d (2), dependenţa specificităţii imunologice de structura chimică este atestată de următoarele fapte experimentale :

— Proteinele cu o structură chimică diferită pot fi întotdeauna diferenţiate imunologic.

— Polizaharidele înrudite structural dau reacţii imunologice încrucişate. Se constată că două polizaharide, care prezintă o reacţie încrucişată, posedă întotdeauna unul sau mai mulţi constituenţi comuni. Astfel, prezenţa acidului celobiuronic în molecula polizaharidelor extrase atît din pneumococul III, cît şi din pneumococul VIII explică reacţia încrucişată care se observă între aceste două tipuri de pneumococi.

---

[1] Reacţiile încrucişate între antigene unitare trebuie deosebite de unele reacţii încrucişate aparente, care au loc între amestecuri de antigene. Un animal injectat cu un amestec de antigene elaborează anticorpi distincţi faţă de fiecare din antigenele din amestec. Dacă alt amestec de antigene este capabil de a reacţiona cu aceşti anticorpi, reacţia poate avea două cauze : 1) există un antigen identic în ambele amestecuri şi în acest caz este vorba de o reacţie încrucişată aparentă ; 2) există o asemănare chimică între două antigene din amestec şi în acest caz se petrece o reacţie încrucişată adevărată.

Scanned with OKEN Scanner

— Haptenele dau de asemenea reacţii încrucişate dacă au o structură chimică asemănătoare.

— Modificarea structurii chimice a unui antigen dat determină şi schimbarea specificităţii sale imunologice. Astfel, prin denaturare, proteinele pierd în mare măsură capacitatea de a reacţiona cu antiserul preparat faţă de proteina nativă. Această capacitate redusă a proteinei denaturate de a fixa anticorpii se datoreşte faptului că anumite părţi ale suprafeţei sale sînt modificate prin denaturare.

— Proteinele care îndeplinesc funcţii biochimice similare în specii diferite au capacitatea de a reacţiona încrucişat, datorită structurii lor asemănătoare. De exemplu, insulinele obţinute de la specii diferite (om, bou, oaie, cal şi porc) nu prezintă deosebiri structurale decît la nivelul aminoacizilor din poziţia 8, 9 şi 10 din lanţul A. De aceea, nu este surprinzător faptul că aceste insuline reacţionează încrucişat (17) (18).

IV. TIPURILE DE SPECIFICITATE IMUNOLOGICĂ

1. Specificitatea de specie

Specificitatea este de obicei diferită cînd proteinele provin de la specii diferite. Cu cît două specii sînt mai apropiate din punct de vedere taxonomic, cu atît mai mare este apropierea imunologică a proteinelor lor. Dacă un animal este imunizat cu un antigen de la o specie dată, anticorpii formaţi vor reacţiona cel mai intens cu antigenul omolog care a servit la imunizare, dar va reacţiona într-o măsură mai mică sau chiar de loc cu celelalte antigene similare din alte specii (tabelul nr. 1).

TABELUL NR. 1

Reacţii încrucişate între albuminele diferitelor specii (valorile sînt exprimate în procente, reacţia omologă fiind notată cu 100) (adaptat după P. H. Maurer, 1954)

Antigenul	Serul imun de iepure preparat faţă de :		
	albumină serică de om	albumină serică de bou	ovalbumină
Albumină serică de om	100,0	6,0	7,3
Albumină serică de bou	5,7	100,0	14,9
Ovalbumină	7,4	4,8	100,0

2. Specificitatea de grup

Nu toţi indivizii care aparţin unei specii date posedă acelaşi fel de antigene. Descoperirea grupelor sanguine a arătat că indivizii unei specii pot să se deosebească între ei după cum posedă sau nu posedă un

Scanned with OKEN Scanner

antigen oarecare. Prin injectarea unui antigen la indivizi din aceeaşi specie, dar care nu posedă acest antigen, se pot obţine anticorpi specifici. Antigenele care pot diferi în sînul aceleiaşi specii, deşi provin de la acelaşi ţesut, se numesc *izoantigene*, iar anticorpii corespunzători, *izoanticorpi*.

Două antigene A şi B pot fi distribuite în eritrocitele indivizilor aparţinînd unei singure specii, în următoarele combinaţii, care alcătuiesc de altfel şi principalele grupe sanguine cunoscute astăzi :

Denumirea grupei	Antigenul în eritrocit
O	—
A	A
B	B
AB	A + B

3. Specificitatea de organ

Anticorpii obţinuţi faţă de antigenele extrase dintr-un organ oarecare pot să reacţioneze cu antigenele din organul respectiv, aparţinînd însă altor specii. Aceste reacţii încrucişate sînt cunoscute sub denumirea de specificitate de organ şi se datorează structurii chimice asemănătoare a acestor antigene. Astfel de reacţii încrucişate se manifestă nu numai la specii apropiate taxonomic, ci şi la cele care n-au nici un fel de înrudire taxonomică. Ca exemplu poate fi citată reacţia încrucişată pe care o dă proteina din cristalinul de peşte cu cea din cristalinul mamiferelor.

Prezenţa antigenelor organospecifice permite însă şi diferenţierea imunologică a diferitelor organe ale aceluiaşi individ. Această comportare apare normală dacă se are în vedere faptul că diferenţierea funcţională a organelor decurge din diferenţierea care există între substanţele chimice (proteine) care alcătuiesc organele respective. În tabelul nr. 2 se dau rezultatele unor cercetări care demonstrează specificitatea de organ la pisică.

TABELUL NR. 2

Reacţii încrucişate între antigenele obţinute din diferite organe de pisică (valorile sînt exprimate în procente, reacţia omologă fiind notată cu 100) (adaptat după K. Landsteiner şi colab., 1927)

Materialul din care s-a obţinut antigenul	Serul imun de iepure preparat faţă de :			
	trahee	timus	rinichi	spermă
Trahee	100	25	12,5	0
Timus	25	100	0	25
Rinichi	12,5	0	100	25
Spermă	0	0	0	100

Scanned with OKEN Scanner

4. Specificitatea funcțională

Proteinele care îndeplinesc în organism funcții diferite nu prezintă reacții încrucișate, chiar dacă provin de la același individ. Astfel, hemoglobina este diferită imunologic de albumina serică, și aceasta din urmă de globulina serică. Pe de altă parte, proteinele care îndeplinesc funcții similare în organism au în general o structură chimică și antigenică asemănătoare, chiar dacă provin de la specii diferite. Această asemănare antigenică este cunoscută sub denumirea de specificitate funcțională. Astfel, de exemplu albuminele, globulinele, insulinele, tireoglobulinele etc. de la diferite animale sînt capabile să reacționeze încrucișat. În cazul insulinei, specificitatea funcțională face ca acest hormon să aibă o antigenicitate slabă, ceea ce permite administrare parenterală la diabetici a insulinelor străine (de bou).

V. GRUPĂRILE DETERMINANTE

Pentru manifestarea activității imunologice nu este necesară întreaga moleculă a antigenului. Specificitatea antigenului este determinată numai de o parte a moleculei sale, alcătuită dintr-o grupare chimică sau un ansamblu de grupări chimice denumit *grupare determinantă*.

În cazul proteinelor, gruparea determinantă rezultă din aranjarea unui grup de resturi de aminoacizi la suprafața moleculei. Aceste resturi de aminoacizi pot constitui o zonă activă la suprafața antigenului, dotată cu o polaritate electrică caracteristică. Este posibil ca oricare porțiune din molecula proteică să fie capabilă de a funcționa ca grupare determinantă, specificitatea ei fiind hotărîtă de numărul și aranjarea diferiților aminoacizi.

Aria ocupată de o grupare determinantă pe suprafața moleculei proteice nu depășește 100—200 Å, ceea ce înseamnă că gruparea determinantă nu poate fi alcătuită din mai mult de 3—4 resturi de aminoacizi (4). Este deci posibil ca într-o moleculă de antigen să existe un număr considerabil de grupări determinante.

În prezent se consideră că grupările determinante sînt reprezentate printr-un aranjament oarecare, deocamdată necunoscut, al resturilor de aminoacid pe suprafața moleculei. Dintre toate aranjamentele posibile de 3—4 aminoacizi pot funcționa ca grupări determinante antigenice numai acelea care nu există în proteinele animalului formator de anticorpi. În molecula proteică globulară, lanțul polipeptidic are o dispoziție helicoidală, astfel că resturile de aminoacizi orientate spre interiorul moleculei sînt lipsite de posibilitatea de contact cu anticorpii și de aceea numai resturile de aminoacizi orientate spre exteriorul moleculei pot să contribuie la alcătuirea grupărilor determinante.

Deoarece pînă acum nu se cunoaște configurația chimică a grupărilor determinante, în mod corespunzător nu se poate stabili exact nici numărul

Scanned with OKEN Scanner

grupărilor determinante existente într-o singură moleculă proteică. Un antigen format dintr-un singur fel de molecule poate conține mai multe grupări determinante. În cazul polizaharidelor se admite că grupările determinante sînt reprezentate din cîteva (3—6) zaharuri terminale din lanțul principal sau din catenele laterale ale moleculei.

Informații asupra numărului de grupări determinante se pot obține prin analiza compoziției unui precipitat antigen-anticorp, determinînd numărul maxim de molecule de anticorp care se pot combina cu o moleculă de antigen. Acceptînd că o moleculă de anticorp se combină numai cu o singură grupare determinantă a antigenului, numărul de molecule de anticorp care se combină cu o singură moleculă de antigen va indica numărul grupărilor determinante ale antigenului. Acest număr este cunoscut sub denumirea de *valența antigenului*. În tabelul de mai jos sînt trecute valorile valenței, determinate pentru cîteva proteine.

TABELUL NR. 3

Valența unor antigene proteice

Antigenul	Greutatea moleculară ($\times 10^3$)	Valența (numărul grupărilor determinante)
Ribonucleaza	13	2—3
Ovalbumina	43—44	5
Albumina serică de om	69—70	6—8
Toxina difterică	70—72	8—12
Ureaza	483	40
Tireoglobulina	650	40
Hemocianina	6 500	74—231

Nu toate grupările determinante de pe suprafața unei molecule de antigen sînt identice. De aceea, chiar față de un antigen unitar, format din molecule identice, se poate forma o familie de anticorpi cu o specificitate bine exprimată, corespunzătoare la fiecare dintre grupările determinante, existente în moleculă. Astfel, un antigen care poartă două grupări determinante distincte A și B, va da naștere la două familii de anticorpi, anti-A și anti-B.

Existența mai multor grupări determinante distincte, grefate pe o singură moleculă de antigen, a fost dovedită prin scindarea enzimatică a antigenelor proteice.

Astfel, albumina serică umană poate fi scindată de către proteazele din splina de iepure în trei fragmente, fiecare posedînd grupări determinante caracteristice (9) (10).

Scanned with OKEN Scanner

Drept urmare, trebuie avut în vedere că apariţia mai multor tipuri de anticorpi în sîngele animalelor imunizate cu o proteină presupusă unitară poate avea două cauze [1]:

— Proteina este într-adevăr unitară, însă conţine mai multe grupări determinante distincte (atîtea grupări cîte tipuri de anticorpi se pun în evidenţă).

— Proteina nu este în realitate unitară, ci conţine mai multe antigene individuale, faţă de care au apărut anticorpi distincţi în sîngele animalelor imunizate.

Bibliografie

1. Allen P. Z. a. Kabat E. A., J. Exp. Med., 1957, **105**, 383.
2. Boyd W. C., Fundamentals of Immunology, Intersci. Publ., New York, Londra, 1956, 112.
3. Clark W. R., Mc Lauchlin J. a. Webster M. E., J. Biol. Chem., 1958, **230**, 81.
4. Haurowitz F., J. Cell. Comp. Physiol., 1956, **47**, Suppl. 1,1.
5. Heidelberger M. a. Avery O. T., J. Exp. Med., 1923, **38**, 73.
6. Jones J. K. N. u. Perry M. B., J. Am. Chem. Soc., 1957, **79**, 2787.
7. Kabat E. A. a. Berg D., J. Immunol., 1953, **70**, 514.
8. Landsteiner K. a. van der Scheer J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1927, **25**, 140.
9. Lapresle C., Ann. Inst. Pasteur, 1955, **89**, 654.
10. Lapresle C. a. Webb T., Biochem. J., 1960, **76**, 538.
11. Maurer P. H., J. Exp. Med., 1954, **100**, 497.
12. — J. Exp. Med., 1954, **100**, 515.
13. — J. Immunol., 1957, **79**, 84.
14. — J. Immunol., 1959, **83**, 193.
15. — J. Immunol., 1963, **90**, 493.
16. — J. Immunol., 1954, **72**, 119.
17. Moloney P. J. a. Coval M., Biochem. J., 1955, **59**, 179.
18. Moloney P. J. a. Goldsmith L., Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, **35**, 79.
19. Reeves R. E. a. Goebel W. F., J. Biol. Chem., 1941. **139**, 511.
20. Staub A. M., Exp. Ann. Biochim. Méd., 1960, **22**, 41.

[1] Există şi o eterogenitate a anticorpilor cauzată de modul lor de formare (18). Ea este prezentată în capitolul VII.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL II-LEA. PREPARAREA ANTIGENELOR

ANTIGENELE se găsesc în umori şi celule sub forma unor amestecuri complexe în asociaţie cu numeroase substanţe chimice neantigenice, ca lipide, glucide etc. La obţinerea antigenelor, experimentatorul trebuie să ţină seama atît de mediul natural din care trebuie izolat antigenul (celulă, umoare), cît şi de natura şi de proprietăţile chimice ale antigenului. Dacă cel de-al doilea factor este mai uşor de apreciat, majoritatea antigenelor fiind proteine, mediul din care se izolează antigenul îşi pune amprenta asupra metodicii de preparare a antigenelor. Astfel, imunizarea animalelor faţă de antigenele umorale se realizează prin simpla injectare în cantităţi determinate a umorii ca atare (de ex. ser sanguin, lapte etc.). Dacă se urmăreşte obţinerea anticorpilor numai faţă de *un singur antigen* din umoarea studiată este, desigur, necesară izolarea din mediu şi purificarea lui minuţioasă. Pentru antigenele proteice din serul sanguin, literatura de specialitate conţine numeroase indicaţii după care fiecare component poate fi izolat şi purificat în condiţii optime.

Imunizarea animalelor cu *antigene celulare* implică o metodică mai laborioasă de preparare a lor. Desigur că această afirmaţie este valabilă numai în cazul în care experimentatorul doreşte să folosească un material antigenic *izolat* din celule. În caz contrar, se pot folosi antigenele celulare fără nici un fel de preparare prealabilă, administrînd animalelor celule sau bacterii intacte, sub forma unor suspensii. Folosirea celulelor sau bacteriilor intacte este limitată, deoarece în aceste cazuri este posibil ca substanţe haptenice de natură polizaharidică sau lipidică sau chiar unii compuşi relativ simpli să formeze, prin intermediul proteinelor din materialul injectat, un antigen complet, cu specificitate caracteristică. În aceste cazuri între două materiale antigenice se pot obţine reacţii încrucişate, datorită posedării în comun a unor haptene şi nici de cum a antigenelor proteice, ceea ce poate conduce la concluzii eronate.

Prepararea antigenelor celulare se impune deci în toate cazurile şi mai cu seamă în analiza imunochimică a unui compus individual. Este recomandabilă folosirea unor antiseruri monospecifice, dirijate numai faţă de compusul care se studiază, în locul antiserurilor care conţin anticorpi faţă de toate antigenele celulei.

În celulă, antigenul studiat se găseşte atît împreună cu substanţe de aceeaşi natură chimică, cît şi cu substanţe diferite. De aceea, tehnica preparării antigenului implică atît separarea lui de substanţele neantigenice, cît şi de cele antigenice cu o natură chimică asemănătoare. Purifi-

3 — c. 230

Scanned with OKEN Scanner

carea antigenului de substanţele cu o natură chimică diferită se realizează întotdeauna mai uşor şi mai complet decît de substanţe cu o natură chimică asemănătoare.

Gradul de purificare a antigenului în scopuri imunochimice trebuie să fie foarte înaintat. În timpul manipulărilor se rup asociaţiile complexe în care se găsesc antigenele proteice, asociaţii care reprezintă probabil unităţi funcţionale în celula vie. De exemplu, asociaţiile lipoproteice sînt foarte fragile, fiind distruse chiar de manipulări relativ blînde. Stabilitatea asociaţiilor lipoproteice la diferite tratamente curente este ilustrată în tabelul nr. 4.

TABELUL NR. 4

Stabilitatea diferitelor legături lipide-proteine sub influenţa unor tratamente (adaptat după P. I. Folch şi colab., 1953)

Tratament	Legătură lipidă — proteină			
	lipoproteină plasmatică	lipo-nucleo-proteină din creier	lipoproteină din creier	proteolipidă *
Liofilizare	nestabilă	stabilă	stabilă	stabilă
Etanol-eter la —10°C	„	„	„	„
Etanol-eter la temperatura camerei	„	„	„	„
Cloroform-metanol	„	nestabilă	„	„
Acid clorhidric cloroform-metanol	„	„	nestabilă	„

* Proteolipidele, insolubile în apă, se găsesc în toate ţesuturile animalelor.

Distrugerea asociaţiilor complexe în care intră antigenele proteice nu afectează decît legăturile dintre părţile componente, de aceea, pînă la găsirea unei tehnici care să permită obţinerea complexelor într-o formă nativă, antigenul ca atare poate fi studiat cu succes în urma disocierii complexelor. De altfel, în unele cazuri aceste asociaţii pot reprezenta artefacte care se formează în cursul izolării antigenului.

Datele de mai sus subliniază extrema grijă cu care trebuie efectuate operaţiile de pregătire a antigenului în vederea imunizării animalelor, ştiind că numai o pregătire corectă a antigenului asigură efectuarea cu succes a unei analize imunochimice.

În cadrul acestor operaţii se disting trei etape importante care concură spre obţinerea unui preparat antigenic activ cu un înalt grad de puritate : izolarea, purificarea şi concentrarea. La prepararea fiecărui antigen se parcurg aceste trei etape într-un mod caracteristic, dependent de sursa din care trebuie izolat antigenul, structura lui chimică şi proprietăţile sale fizice, chimice şi biologice, şi scopul analizei imunochimice la care

Scanned with OKEN Scanner

urmează să fie supus. De aceea, pentru două antigene distincte, care se izolează din ţesuturi diferite şi au o structură chimică şi proprietăţi diferite, nu se va urma exact aceeaşi cale de preparare. Din acest motiv, nu este posibilă prezentarea unei căi unice, generale, de preparare a antigenelor, care să fie aplicabilă la fiecare antigen în parte. În cadrul acestui capitol vor fi prezentate principalele operaţii care se efectuează în cursul celor trei etape de preparare a antigenelor, urmînd ca experimentatorul să hotărască în alegerea şi combinarea celor mai potrivite dintre ele.

I. IZOLAREA ANTIGENELOR

Alegerea sursei pentru izolarea antigenului este limitată de scopul cercetării. Dorind să studieze sub aspect imunochimic tireoglobulina, este evident că experimentatorul va putea să aleagă ca sursă pentru izolarea acestui antigen numai glanda tiroidă. El va putea hotărî numai asupra speciei din care trebuie izolat acest hormon. Libertatea de alegere intervine numai dacă antigenul este distribuit în mai multe organe. De exemplu, amilaza poate fi izolată atît din glanda salivară, cît şi din pancreas. În aceste cazuri, trebuie aleasă sursa de antigen, judecînd nu numai după *cantitatea* în care se găseşte acesta, ci şi după *uşurinţa* cu care se poate izola şi apoi purifica de substanţele însoţitoare.

Fixat asupra materialului din care trebuie izolat antigenul, experimentatorul trebuie să evite de la început posibilitatea de impurificare a antigenului celular cu proteinele din sînge. În aceste cazuri, înainte de a rupe celula, experimentatorul trebuie să o „cureţe" de antigenele din sînge. În acest scop se recurge întotdeauna la perfuzarea organelor care conţin antigenul studiat şi ale căror vase sanguine pot fi canulate. Nu se va renunţa la perfuzie decît la organele a căror canulare prezintă mari dificultăţi sau dacă prezenţa proteinelor serice nu este incompatibilă cu scopurile urmărite de cercetare.

După perfuzie, organul este supus unor operaţii de rupere a membranelor celulare, pentru ca în acest fel conţinutul celular să fie accesibil extracţiei. Alegerea extractantului se face ţinînd seama de solubilitatea antigenului care urmează să fie izolat. În extractul brut, antigenul se găseşte într-un procent variabil alături de alte componente, urmînd apoi etapele de purificare şi concentrare.

1. Perfuzia

Izolarea antigenelor tisulare trebuie efectuată la adăpost de posibilitatea contaminării lor cu antigenele serice. Această posibilitate este reală dacă ţinem seama de faptul că unele organe conţin cantităţi importante de sînge (de ex. ficatul de şobolan conţine 20 ml sînge/100 g ţesut). Gradul contaminării depinde de conţinutul organelor în sînge. Contaminarea

Scanned with OKEN Scanner

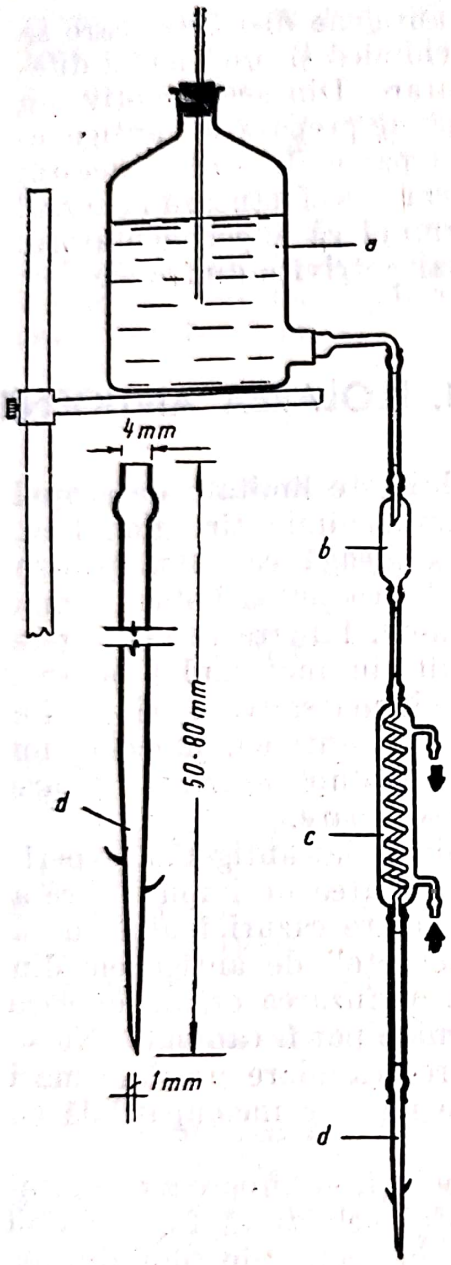


Fig. 1. — Schema dispozitivului de perfuzie. a, Vas Mariotte; b, numărător de picături; c, refrigerent; d, canulă de sticlă.

îngreuiază cercetările imunochimice, deoarece face necesară stabilirea participării „impurităţilor sanguine" la reacţiile imune.

Chiar în urma perfuziilor prelungite ale organelor se mai păstrează o contaminare sanguină reziduală (32). Ea este destul de mare la rinichi, moderată la ficat şi neînsemnată la creier şi limbă (0,8 ml sînge/100 g ţesut), însă, în aceste cazuri, impurităţile sanguine sînt în cantitate prea mică pentru a putea interfera în analiza imunochimică a proteinelor tisulare (33).

La practicarea perfuziei organelor, trebuie respectate cîteva indicaţii legate de debitul de perfuzie, de compoziţia şi temperatura soluţiei saline şi de tehnica izolării organelor.

Debitul de perfuzie poate fi continuu sau intermitent (introducerea soluţiei se întrerupe la intervale regulate). Pentru scopuri imunologice este preferabilă perfuzia intermitentă, deoarece ea îndepărtează aproape în întregime sîngele din organe. Viteza perfuziei se controlează conexînd la tubul de cauciuc care porneşte de la rezervorul cu lichidul de perfuzie un numărător de picături, (fig. 1). Pe traiectul tubului de cauciuc nu trebuie să existe bule de aer. Introduse o dată cu lichidul în organe, bulele produc în vase perne de aer care stînjenesc circulaţia lichidului într-un teritoriu al organului respectiv. Viteza de perfuzie în experienţele de tip imunochimic este la început ceva mai mică, iar spre sfîrşitul experienţei se măreşte. Această creştere a vitezei se realizează prin ridicarea vasului de perfuzie la o înălţime mai mare.

Perfuzia se poate efectua cu clorură de sodiu 0,15 M sau zaharoză 0,25 M. Este preferabilă utilizarea soluţiei saline fiziologice, deoarece ea spală sîngele mai complet ca zaharoza (5). Temperatura soluţiei perfuzate, care trebuie să fie de 4°C, se realizează prin răcirea unei porţiuni din instalaţia de perfuzie cu un manşon refrigerent.

Perfuzia poate fi efectuată atît *in situ*, organul fiind izolat de circulaţia sanguină, dar păstrîndu-şi legăturile nervoase cu restul corpului, cît şi pe organ izolat, acesta fiind scos cu ajutorul unei tehnici chirurgi-

cale adecvate din organism. În ambele cazuri, lichidul de perfuzie se introduce printr-o arteră principală şi iese printr-o venă principală, celelalte vene şi artere fiind ligaturate.

Pentru a ilustra tehnica de lucru se vor da două exemple de perfuzie, pe organ izolat şi *in situ*.

Perfuzia ficatului izolat de şobolan prin vena portă (76)

Animalul, în greutate de aproape 350 g, este narcotizat cu uretan prin injecţii intraperitoneale (0,5 ml dintr-o soluţie de 20 g%, pentru 100 g greutate corporală). După fixarea şobolanului anesteziat pe o planşetă, se practică o laparatomie mediană, mergînd de la pubis la apendicele xifoid. Se prelungeşte apoi deschiderea lateral de o parte şi de alta, urmînd marginea inferioară a toracelui. Astfel, ficatul şi anexele sale sînt bine vizibile şi uşor de izolat. Se eliberează apoi ficatul de aderenţele peritoneale, secţionînd şi coledocul. Degajarea micului lob situat înapoia stomacului se face după separarea stomacului de esofag, prin secţionare între două ligaturi.

În continuare, se izolează vena portă, iar o venă colaterală provenind de la ficat se secţionează între două ligaturi. Se pensează apoi vena portă cît mai aproape de ficat cu ajutorul unei pense Kocher, aşezată de-a latul animalului. În urma pensării, vena portă se umflă şi se poate canula cu uşurinţă. Canularea pe viu este necesară chiar în cazul în care se perfuzează organe izolate, deoarece canularea venei porte după izolarea ficatului este dificilă.

Pentru canulare se pot folosi canule simple de sticlă cu vîrful neted, avînd un diametru interior de 1 mm (fig. 1, *d*). Se umple în prealabil canula cu lichidul de perfuzie şi se pensează tubul de cauciuc în partea superioară pentru a împiedica scurgerea lichidului. Se „ciupeşte" vena portă cu o foarfecă fină ; imediat se introduce în incizia practicată canula, care se leagă solid cu ajutorul unui fir de aţă aşezat în prealabil sub vena portă. După legarea vasului de canulă, firele de aţă se fixează de aripioarele canulei pentru a împiedica desfacerea ei de vas în timpul manipulărilor. Se îndepărtează pensa Kocher şi vena portă se secţionează între două ligaturi practicate în spatele canulei.

Ficatul se scoate liberîndu-l de restul organismului cu ajutorul foarfecelor, avînd grijă să nu-l lezăm. Organul izolat se aşază pe o suprafaţă răcită şi apoi se conectează canula la dispozitivul de perfuzie. Aceste manipulări trebuie făcute cu grijă, pentru a evita perforarea venei porte de către vîrful canulei.

Perfuzatul, soluţie de clorură de sodiu 0,15 M, pătrunde prin canula venei porte şi iese prin vena cavă inferioară secţionată cu ocazia scoaterii ficatului din organism. Temperatura lichidului de perfuzie trebuie să ajungă în decurs de cîteva minute la 4°C. Înălţimea nivelului soluţiei de perfuzat, în raport cu animalul, este la începutul experienţei de 50 cm, iar spre sfîrşitul ei de 75 cm. Durata perfuziei se apreciază după gradul de decolorare a ficatului, precum şi după absenţa proteinelor serice din lichidul care a spălat organul. Pentru siguranţă, se preferă îndepărtarea zonelor de ţesut imperfect decolorate, iar la sfîrşitul perfuziei se spală organul şi la exterior cu soluţia care l-a irigat.

Perfuzia in situ a creierului de iepure (31)

Se injectează în vena marginală a urechii unui iepure de 2 kg, 10 mg heparină dizolvată în 1 ml solvent. După 15 min se efectuează anestezia generală cu o soluţie de uretan, administrată lent, intravenos (2 g/kg corp).

Scanned with OKEN Scanner

Pregătirea animalului şi abordarea arterelor carotide sînt descrise în capitolul VI al lucrării. Se disecă arterele carotide, se introduce rapid în fiecare din ele o canulă de 1 mm diametru, după tehnica descrisă mai sus. Arterele carotide se secţionează apoi între două ligaturi practicate în spatele canulei. Se disecă şi venele jugulare şi se introduc în ele canule. Astfel, lichidul de perfuzie poate fi prelevat cu uşurinţă.

Perfuzia se realizează cu o soluţie de clorură de sodiu 0,15 M sau cu zaharoză 0,25 M, la 4°C. După 1 oră, spălarea creierului este terminată. Se opreşte perfuzia, se scoate creierul din cutia craniană, se îndepărtează meningele şi se spală de cîteva ori cu soluţia care l-a irigat.

2. Ruperea membranei celulare

Pentru a extrage antigenele din interiorul celulei, trebuie ruptă membrana celulară. Pentru scopuri imunochimice pot fi folosite cu succes numai procedeele blînde care nu alterează structura antigenelor.

Alegerea metodelor de rupere a celulelor trebuie să se facă ţinînd seama şi de proveniența lor. Pentru celulele animale se folosesc în general metode mai blînde decît pentru celule vegetale sau bacteriene a căror membrană celulozică este mai rezistentă.

Pentru celulele animale, cel mai indicat procedeu este omogenizarea. Ea poate fi realizată atît cu omogenizatoare coaxiale, cît şi cu omogenizatoare cu cuţite (Waring-blendor). Principalul avantaj al omogenizării este acela că îmbină operaţia de rupere a membranei celulare cu cea de extracţie a antigenelor. Mediul de extracţie în care se efectuează omogenizarea se alege ţinînd seama de localizarea intracelulară a antigenului. Pentru antigene localizate în citoplasma celulelor, mediul de extracţie trebuie să aibă capacitate de solubilizare a antigenului. Pentru antigene localizate în formaţiuni intracelulare (nucleu, mitocondrii, microzomi) se foloseşte mai întîi un mediu de izolare care permite obţinerea cantitativă a formaţiunii intracelulare dorite, necontaminată cu alte formaţiuni. Extragerea antigenelor din aceste formaţiuni se realizează ulterior prin procedee speciale, care sînt prezentate în anexa I.

Prin omogenizare trebuie realizată ruperea membranei celulare cu un minim de alterări a antigenelor citoplasmatice şi a formaţiunilor intracelulare, mai ales dacă acestea constituie ulterior sursa de antigene. Urmărind acest scop, experimentatorul trebuie să ţină seamă de următoarele indicaţii :

a) Izolarea organului trebui să se facă cît mai repede posibil.

b) Perfuzia trebuie efectuată la o temperatură cît mai scăzută, după o tehnică care să permită îndepărtarea proteinelor nedorite într-un timp cît mai scurt posibil.

c) Trebuie îndepărtate regiunile din organ care în mod cert nu conţin antigenul cercetat (depozitele de grăsime, aponevrozele, ţesutul conjunctiv).

d) Operaţia de omogenizare trebuie să decurgă foarte repede şi la o temperatură cît mai apropiată de temperatura de îngheţare a omogenatului. În acest fel, autoliza este redusă la minimum.

Scanned with OKEN Scanner

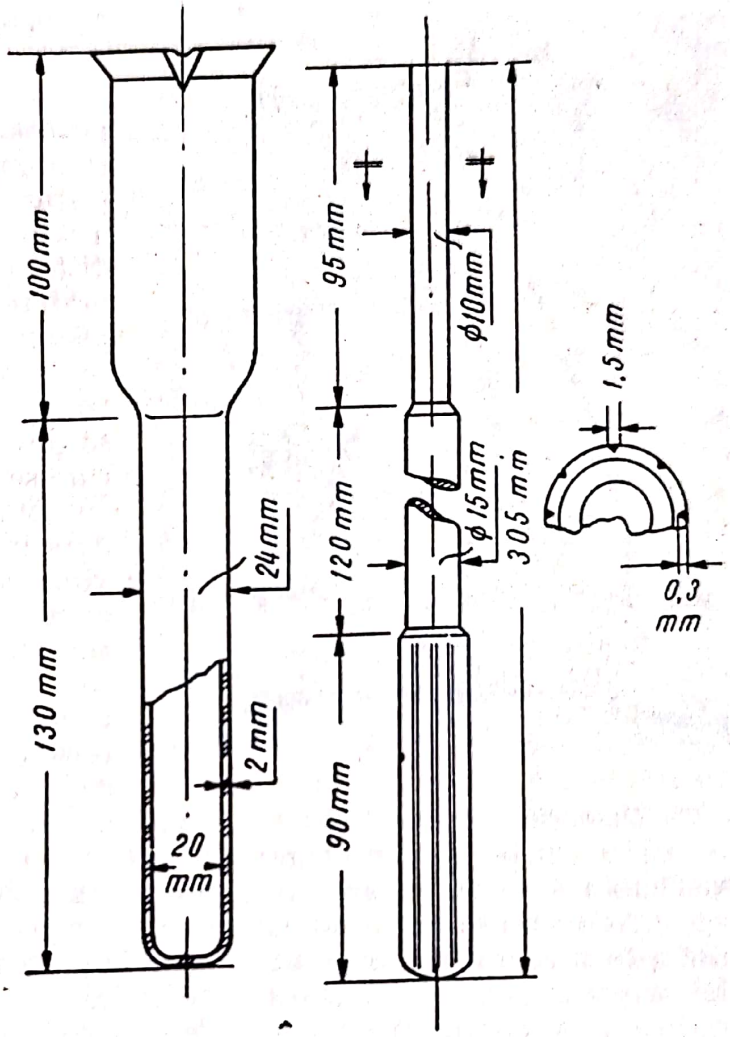


Fig. 2. — Schema omogenizatorului coaxial cu şanţuri (după H. Börning şi colab., 1961).

Omogenizatorul coaxial. A fost introdus în practica laboratoarelor de V. R. Potter şi C. A. Elvehjem (117) (116). Pînă în prezent s-au construit foarte multe tipuri de omogenizatoare, unele dintre ele prezentînd avantaje certe faţă de modelul iniţial. Dintre acestea, tipul prezentat mai jos (fig. 2) are caracteristici de funcţionare care îl recomandă pentru omogenizări destinate izolării antigenelor (18).

Recipientul este din sticlă, iar pistonul din plexiglas avînd 12 canale liniare longitudinale. Distanţa dintre piston şi peretele recipientului este de 0,05 - 0,1 mm. Recipientul se imersează într-un vas cu gheaţă, care asigură menţinetea temperaturii la 0°C. Se adaugă ţesutul care a fost în prealabil mărunţit cu o foarfecă, împreună cu extractantul sau mediul de izolare. Se fixează pistonul într-un motor care îi poate imprima o rotaţie variabilă, cuprinsă între 500 şi 1000 rot/min. Recipientul omogenizatorului se mişcă în sus şi în jos printr-o mişcare continuă de du-te-vino care împinge omogenatul în spaţiul de deasupra sau de dedesubtul pistonului. Cu aparatul descris mai sus, omogenizarea ţesutului hepatic nu durează mai mult de 30 sec, inclusiv pauza de răcire (10 sec) şi se realizează cu mişcări du-te-vino repetate de 6 ori (turaţia motorului 700-800 rot/min). În general, omogenizarea durează mai mult (2-5 min), în funcţie de proveniența ţesutului. Se vor respecta întotdeuna, la interval de 30 sec, pauzele de răcire cu o durată egală cu jumătate din timpul pe care îl cere omogenizarea propriu-zisă.

În omogenizatorul coaxial, ruperea membranei celulare se realizează datorită forţelor de forfecare create de gradientul de viteză al lichidului în spaţiul inelar dintre piston şi recipient. Deoarece recipientul este fixat, în timp ce pistonul se roteşte, viteza lichidului are valori care

Scanned with OKEN Scanner

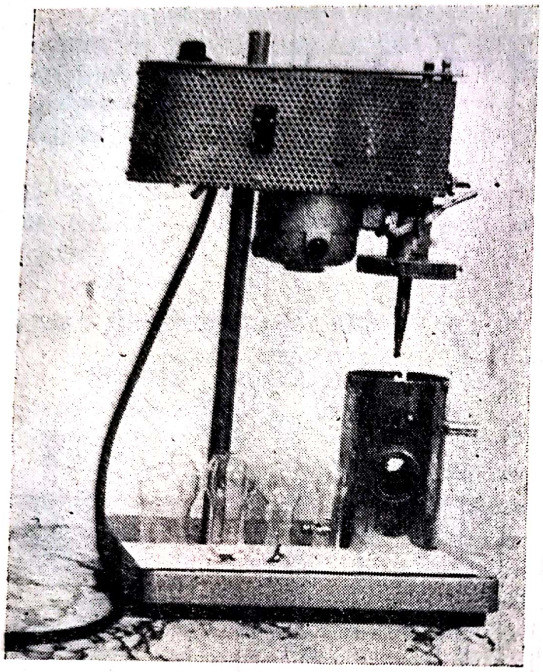


Fig. 3. — Omogenizator cu cuțite.

pornesc de la minim (lîngă perete) și ajung la maxim, la suprafața pistonului, gradientul fiind cu atît mai pronunțat cu cît este mai mică distanța radială dintre aceste suprafețe și cu cît viteza de rotație a pistonului este mai mare. Încălzirea locală datorită frecării este neutralizată de vasul cu gheață în care se găsește recipientul și de pauzele care se fac în cursul omogenizării. În omogenizatorul cu dimensiunile date în figură, se pot folosi aproximativ 25 ml de suspensie. Dacă organul omogenizat conține țesut conjunctiv, eficiența omogenizării scade. Cantități mari din acest țesut produc blocarea pistonului, ceea ce micșorează randamentul ruperii celulare.

Omogenizatorul cu cuțite (*Waring-blendor*). Aparatul constă dintr-un agitator cu cuțite de mare turație (10 000 -15 000 rot/min), montat într-un vas cilindric ai cărui pereți sînt ondulați, formînd o secțiune foliară (fig. 3).

Agitatorul are un număr variabil de palete de amestecare. Ele sînt ascuțite și așezate în unghiuri diferite față de axul agitatorului. În acest fel, împreună cu neregularitățile peretelui, agitatorul asigură o amestecare eficientă a conținutului. Paletele de amestecare sînt așezate la unele tipuri de omogenizatoare pe un suport care este mișcat de un motor așezat dedesubtul vasului. În aceste cazuri se poate pierde lichid în jurul suportului. Mai bună este agitarea paletelor de amestecare cu un motor așezat deasupra vasului. Acest procedeu elimină pierderile de lichid și permite întrebuințarea vaselor cu o capacitate diferită, fără a modifica agitatorul.

Omogenizatorul cu cuțite provoacă ruperea membranelor celulare nu numai prin forțele de forfecare de care dispune și omogenizatorul coaxial, ci și prin forța de tăiere. De aceea, cu ajutorul acestor omogenizatoare se realizează omogenizarea unor țesuturi ale căror celule nu pot fi rupte cu omogenizatoarele coaxiale. Întrebuințarea lor ar trebui limitată însă numai la aceste cazuri, deoarece turația mare a cuțitelor prezintă o serie de dezavantaje, ca : distrugerea mitocondriilor, inactivarea unor antigene prin înspumare și supraîncălzire. Numai ultimul efect poate fi înlăturat prin introducerea vasului într-o baie exterioară de răcire.

Măcinarea manuală și mecanică. Aceste procedee se aplică în special la ruperea membranelor celulozice ale celulelor vegetale și bacteriene.

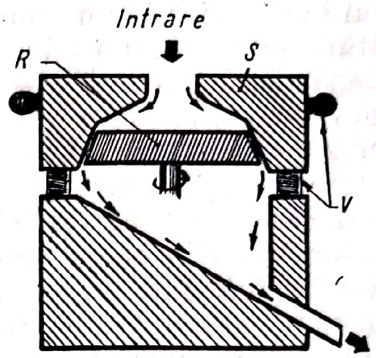


Fig. 4. — Moară coloidală cu spațiu de încălzire reglabil (după V. Allfrey 1959). R, Rotor; S, stator; V, viză de ajustare micrometrică.

Procedeul manual constă în măcinarea materialului într-un mojar răcit, folosind uneori nisip de cuarț și adăugînd extractantul răcit în porțiuni mici. Ruperea membranelor poate fi realizată și prin mojararea materialului înghețat în prealabil cu aer lichid, pînă se obține o pulbere fină. Urmează apoi solubilizarea antigenelor din această pulbere cu un extractant potrivit. Acest procedeu poate fi aplicat cu succes și la ruperea membranelor la celulele din semințe. În general pentru extracția antigenelor din semințe se preferă făina obținută prin măcinarea lor. Aplicarea procedeului de mojarare în stare înghețată este recomandabilă numai la semințele care au un conținut ridicat în uleiuri și care nu se pretează la măcinare obișnuită (de exemplu semințele de ricin, mac, cucurbitacee etc.).

Măcinarea mecanică se realizează cu ajutorul morilor coloidale. Ele sînt alcătuite dintr-un trunchi de con, care poate fi rotit la o turație foarte mare într-un alt con exterior imobil (fig. 4). Spațiul dintre conuri este reglabil într-un interval destul de larg. În general se folosesc spații de maximum 0,03 mm. Spațiul foarte mic și viteza de rotație foarte mare a conului mobil creează forțe de forfecare considerabile.

Materialul care trebuie omogenizat se mărunțește cu o foarfecă, se suspendă într-un volum determinat de extractant și se introduce în moara coloidală. Rotația conului mobil dă naștere unei forțe centrifuge care împinge suspensia în afara bazei conului, o trece prin spațiul îngust de forfecare și de aici este trimisă printr-un jgheab pînă la orificiul de colectare. Operația poate fi repetată de cîteva ori pînă se rup toate celulele. Și în acest procedeu, concomitent cu ruperea membranelor celulare, se realizează și extracția antigenelor dorite. Efectul termic rezultat prin frecarea celor două suprafețe este anihilat prin instalația de răcire de care dispun morile coloidale perfecționate.

La microorganisme, ruperea membranelor celulare se realizează în mod curent pe o cale particulară, care implică uscarea preparatelor celulare, urmată de extragerea antigenelor (63). Uscarea se poate face la aer în vacuum peste $CaCl_2$, P_2O_5 sau $CaSO_4$, prin liofilizare și prin deshidratare cu solvenți miscibili cu apa. În ultimul caz, uscarea se realizează în felul următor : suspensia apoasă de celule bacteriene [1] se adaugă sub agi-

[1] Suspensia apoasă bacteriană se realizează astfel : se centrifughează cultura microbiană. Depozitul microbian se spală de cîteva ori cu o soluție salină fiziologică și în cele din urmă se suspendă în această soluție. Trebuie controlat dacă nu cumva spălarea extrage parțial antigenele urmărite de experimentator.

Scanned with OKEN Scanner

tare puternică la un volum de 10 ori mai mare de acetonă, răcită la -20°C. După cîteva minute de agitare se lasă bacteriile să se depună, apoi se îndepărtează cea mai mare parte a supernatantului prin decantare. Restul se filtrează printr-o pîlnie Büchner. Se spală celulele de pe hîrtia de filtru cu 2-5 volume de acetonă răcită tot la -20°C. Se spală apoi cu 2-3 volume de eter etilic şi se usucă la aer. Cînd s-a eliminat tot solventul se obţine o pulbere care se păstrează într-un exsicator la adăpost de umiditatea laboratorului. Din acest preparat uscat cu acetonă se pot extrage antigenele dorite, folosind un extractant potrivit. La unele specii de microorganisme cu membrana mai rezistentă, este necesară mojararea preparatului uscat înainte de extracţie.

3. Extracţia

Alegerea metodei de extragere care urmează a fi aplicată la obţinerea unui antigen dat este foarte importantă. Judicios efectuată, creează premise favorabile pentru prepararea corectă a antigenului. Experimentatorul trebuie să aleagă cea mai potrivită metodă de extragere, ţînînd seama de localizarea intracelulară, natura chimică şi solubilitatea antigenului.

Antigenele localizate în citoplasmă se extrag de obicei printr-o metodă directă, care implică ruperea celulei şi solubilizarea antigenelor în extractant. Astfel, după omogenizarea unui ţesut hepatic cu soluţie fiziologică şi centrifugarea amestecului la o viteză corespunzătoare, în supernatant se găsesc majoritatea antigenelor localizate în citoplasmă.

Antigenele localizate în celelalte formaţiuni intracelulare nu pot fi obţinute în general printr-o metodă de extracţie directă, antigenul fiind intim asociat cu formaţiunea respectivă. Chiar dacă extractantul ar putea scoate antigenul din formaţiunea dată, procedeul ar rămîne neconvenabil, deoarece în acest caz extractul ar fi puternic impurificat cu antigenele citoplasmatice. De aceea, se recurge la izolarea prealabilă a formaţiunilor intracelulare prin procedee de centrifugare fracţionată, după care urmează extracţia antigenelor. Metodele de extracţie aplicate în aceste cazuri depind de structura şi compoziţia chimică a formaţiunii date şi sînt înfăţişate în anexa I.

Natura chimică a antigenelor determină împărţirea extractanţilor în două categorii: extractanţi pentru substanţele proteice şi extractanţi pentru polizaharide.

Extractantul ideal ar fi acela care ar permite izolarea selectivă a antigenului din materialul biologic cercetat. În acest fel, în soluţie ar trece numai antigenul dorit, în timp ce celelalte antigene ar rămîne în materialul biologic. În realitate, majoritatea proteinelor au o solubilitate destul de apropiată, de aceea numai cîteva proteine pot fi obţinute printr-o metodă de extragere selectivă. De exemplu, o soluţie apoasă de etanol 70% extrage din seminţele gramineelor numai prolaminele, nesolubilizînd albuminele şi globulinele.

Scanned with OKEN Scanner

În general însă, alături de antigenul dorit, în extract se găsesc în proporţii variabile şi alte antigene. Proporţia lor poate fi micşorată considerabil dacă se ţine seama că solubilitatea proteinelor variază în mare măsură în funcţie de pH-ul şi puterea ionică a extractantului. În acest scop se poate folosi un extractant cu un pH şi o putere ionică la care se solubilizează o cantitate minimă din antigenele străine, fără ca extractibilitatea antigenului studiat să fie afectată.

Compoziţia extractanţilor. Cele mai folosite soluţii pentru extragerea antigenelor din citoplasma celulelor sînt : apa distilată, soluţie de NaCl 0,15—1,0 M ca atare sau tamponată la pH 7,0 ; tamponul fosfat 0,02—0,1 M pentru pH-uri 5,7—8,0 ; tamponul citrat 0,02 M sau acetat 0,02—0,1 M pentru pH-uri 3,0—6,2.

Importanţa pH-ului şi a concentraţiei saline. Alegerea pH-ului de extracţie depinde foarte mult de stabilitatea şi solubilitatea antigenului proteic care trebuie izolat. Deoarece majoritatea proteinelor au punctul izoelectric în zona acidă (4-6), extracţia se efectuează de obicei la pH-uri alcaline, unde solubilitatea lor este maximă. Nu se depăşeşte totuşi pH-ul 9,0 deoarece deasupra acestei valori, deşi solubilitatea antigenelor continuă să crească, stabilitatea lor scade considerabil. Un mediu prea alcalin modifică sau chiar distruge antigenicitatea proteinelor. Antigenele sînt mai stabile la pH-uri acide, totuşi extracţia în această regiune de pH este limitată de solubilitatea lor redusă (de ex. ribonucleaza se poate extrage din pancreas cu acid sulfuric 0,25 N).

La alegerea molarităţii extractantului trebuie avut în vedere că solubilitatea antigenelor proteice creşte în raport cu concentraţia salină pînă la un maxim, după care scade din nou pînă la anulare, la concentraţii saline crescute. În general, solubilitatea unei proteine nu creşte decît într-o zonă relativ restrînsă de concentraţie salină. Între pH-ul şi molaritatea extractantului trebuie să existe un raport caracteristic, determinat de particularităţile antigenului care se extrage. Astfel, pentru extragerea proteinelor la pH-uri neutre este nevoie de o concentraţie salină mai mare decît în cazurile în care extracţia se efectuează la pH-uri acide sau alcaline. Această necesitate este impusă de influenţa pe care o exercită acţiunea combinată a pH-ului şi a puterii ionice asupra solubilităţii proteinei.

Metode speciale de extracţie. Uneori este necesară îndepărtarea sau distrugerea unor substanţe neproteice (lipide, polizaharide etc.), care pot influenţa atît randamentul extracţiei, cît şi comportarea imunologică a antigenelor.

Necesitatea desprinderii antigenelor proteice de substanţe de natură lipidică este dictată nu numai de împrejurarea că sub formă liberă proteinele sînt mai extractibile, dar şi de dorinţa experimentatorului de a exclude reacţiile stînjenitoare care ar putea avea loc datorită haptenelor lipidice. Îndepărtarea lipidelor din complexele lipoproteice se poate realiza fără nici o denaturare a proteinei asociate, prin prelucrarea materialelor cu n-butanol (98). Tratamentul cu n-butanol se poate aplica atît extractelor apoase, cît şi materialului biologic uscat.

Scanned with OKEN Scanner

În primul caz se adaugă încet, sub agitare, n-butanolul la extractul apos pînă la saturarea acestuia (aprox. 20% v/v n-butanol). Se centrifughează şi se izolează faza apoasă, lipsită de lipide.

În al doilea caz, materialul mojarat la o pulbere fină se dispersează într-un mojar cu n-butanol (50 ml/g substanţă uscată) timp de 20 min, la temperatura camerei. Se separă materialul prin centrifugare şi se extrage încă o dată cu n-butanol. După o nouă centrifugare, urmele de n-butanol se îndepărtează prin extracţie cu acetonă sau eter etilic, la -15°C. Uscarea completă a preparatului se realizează apoi în vid peste $CaCl_2$. În timpul acestor extracţii, apa trebuie complet exclusă pentru a nu produce denaturări ale antigenelor.

Extragerea antigenelor din frunzele plantelor necesită de asemenea măsuri speciale. Fenolii prezenţi în extractele apoase foliare, sub influenţa reacţiilor enzimatice sau neenzimatice, se oxidează la chinonele respective, puternic colorate. O parte din acestea pot reacţiona ireversibil cu proteinele, formînd combinaţii solubile sau insolubile care, desigur, au o structură antigenică diferită de cea a proteinei native. Blocarea acestor reacţii parazitare şi stabilizarea extractelor se realizează adăugînd extractantului obişnuit (de ex. tampon fosfat pH 7,8 0,05 M) următoarele componente (64) (57) : glucoză 1 M, sulfit de sodiu 0,1 M şi mertiolat de sodiu 0,005 M.

Mertiolatul de sodiu se adaugă nu numai la extractele foliare; el trebuie să fie în mod obligatoriu prezent în toate extractele care sînt supuse unor manipulări prelungite la temperatura camerei, pentru a evita infectarea lor.

După alegerea celui mai eficient extractant se trece la extracţia propriu-zisă a antigenelor. Operaţia se efectuează ţinînd seama de raportul dintre volumul extractantului şi greutatea materialului biologic (raport de extracţie), de durata extracţiei şi de temperatura extracţiilor.

Raportul de extracţie. În mod obişnuit, extractantul se adaugă într-un raport de 1 parte material biologic la 2-10 părţi extractant. Printr-o singură extracţie nu se scoate tot antigenul, de aceea operaţia se repetă pînă cînd se epuizează tot antigenul din ţesut. Repetarea extracţiei se face adăugînd tot mai puţin extractant la materialul biologic. În mod obişnuit, sînt suficiente două extracţii succesive, una în raport 1/5, iar a doua în raport 1/2.

Durata extracţiei. De obicei, extracţia însoţeşte operaţia de rupere a membranelor celulare (omogenizarea). Pentru ruperea celulelor sînt suficiente cîteva minute, însă extracţia, fie că se face concomitent cu omogenizarea, fie că se face printr-o operaţie distinctă, trebuie să dureze aproximativ 1 oră. Prelungirea duratei de extracţie la 24 de ore nu conduce la creşterea sensibilă a cantităţii antigenului extras şi deschide posibilitatea denaturării. În timpul extracţiilor este indicată agitarea moderată a amestecului, evitînd spumarea şi încălzirea lui.

Temperatura extracţiei. În timpul extracţiilor este bine ca temperatura amestecului să fie apropiată de 0°C, deşi la temperatura camerei proteinele se extrag în cantităţi mai mari (solubilitatea lor creşte cu mărirea

Scanned with OKEN Scanner

temperaturii). Temperatura camerei scurtează durata extracţiei la aproximativ 30 min, însă nu exclude posibilitatea denaturării proteinelor fie direct, fie prin acţiunea enzimelor proteolitice. Atunci cînd temperaturile scăzute nu oferă garanţia inhibării enzimelor proteolitice, experimentatorul se poate pune la adăpost fie adăugînd extractantului inhibitori specifici, fie efectuînd extracţia la un pH la care proteaza nu este activă. Numai ţinînd seama de aceste posibilităţi, s-a realizat extragerea insulinei intacte din pancreas, cu toată prezenţa enzimelor proteolitice.

Centrifugarea extractelor. Operaţia de extracţie este întotdeauna încheiată de separarea fazei lichide de materialul insolubil, prin centrifugare. Centrifugarea trebuie efectuată la temperatură constantă, scăzută.

Proporţia sedimentării particulelor este direct proporţională cu forţă centrifugală (F), a cărei valoare este determinată la rîndul ei de numărul de rotaţii pe minut (rot/min) şi de raza centrifugii (R) în cm, conform ecuaţiei :

$$F = \frac{4\ \pi^2\ (\text{rot/min})^2}{3\ 600}\ R$$

Este mai comod ca forţa centrifugală să se exprime ca un multiplu al forţei gravitaţionale terestre care acţionează asupra particulelor. Această forţă centrifugală relativă se notează obişnuit cu g, fiind obţinută din relaţia :

$$g = \frac{4\ \pi^2\ (\text{rot/min})^2}{3\ 600 \cdot 981}\ R = 1{,}11 \cdot 10^{-5}\ (\text{rot/min})^2 R$$

Calcularea forţei centrifugale relative (g), prin măsurarea razei (R) şi a numărului de rotaţii pe min (rot/min) se poate efectua cu uşurinţă după nomograma dată mai jos.

Mărimea razei se determină la centrifugile cu eprubete basculante măsurînd distanţa de la axa de rotaţie pînă la fundul eprubetelor ridicate în poziţia de mers (orizontală). La centrifugile unghiulare, raza este egală cu distanţa dintre axa de rotaţie şi extremitatea cea mai depărtată a eprubetei.

Sedimentarea materialului care trebuie îndepărtat sau izolat depinde şi de timpul cît durează centrifugarea. Durata centrifugării este impusă de forţa centrifugală aplicată. Este evident că, la o forţă centrifugală mare, timpul este mai scurt decît la una mai mică.

Viteza de sedimentare a particulelor este determinată nu numai de forţa centrifugală aplicată, ci şi de alţi factori ca : densitatea particulei, densitatea şi viscozitatea mediului. Această dependenţă este exprimată astfel :

— Particulele se depun proporţional cu pătratul razei lor ;

— Viteza de sedimentare este direct proporţională cu diferenţa de densitate dintre particulă şi mediu ;

— Cu cît este mai mare viscozitatea mediului, cu atît este mai înceată sedimentarea.

Scanned with OKEN Scanner

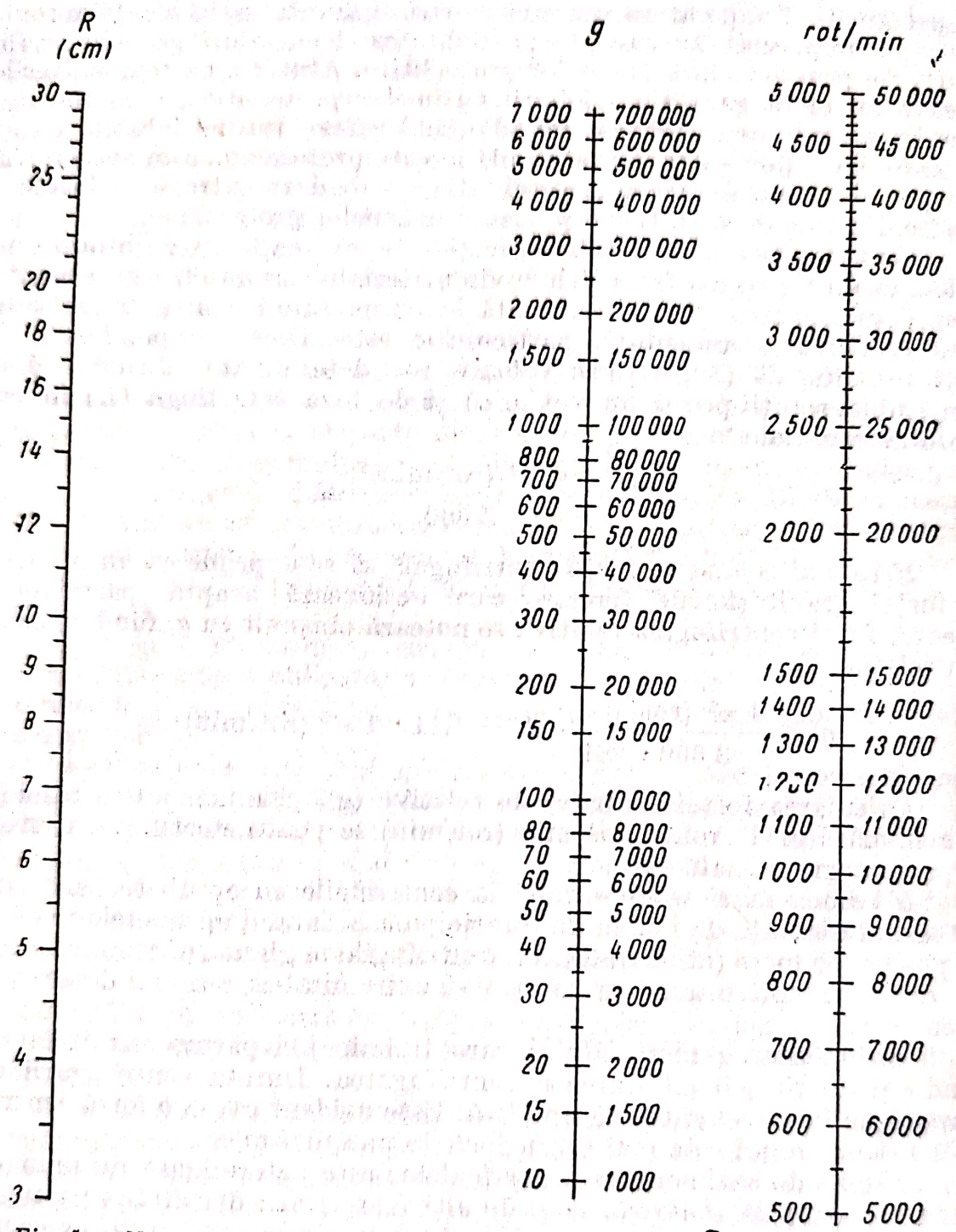


Fig. 5. — Nomogramă pentru calcularea forței centrifugale relative *

* Pentru a calcula forța centrifugală relativă (*g*) cunoscînd raza (*R*) și numărul de rotații pe minut (rot/min) se aliniază valorile corespunzătoare pentru *R* și rot/min pe scările respective și se citește punctul de intersecție pe scara din mijloc (*g*).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru antigenele din citoplasmă trebuie deci ales un extractant cu o viscozitate cît mai mică şi cu o densitate apropiată de cea a apei. În acest fel se va realiza îndepărtarea completă a materialului insolubil într-un timp scurt şi cu o forţă centrifugală moderată. Pentru izolarea formaţiunilor intracelulare nu se pot folosi astfel de medii, deoarece distrug integritatea lor structurală. În aceste cazuri se folosesc medii speciale, care permit izolarea formaţiunilor intacte, însă necesită forţe centrifugale uneori considerabile.

II. PURIFICAREA ANTIGENELOR

Alături de antigenul studiat se pot extrage două categorii de impurităţi : substanţe cu o natură chimică diferită de cea a antigenului şi substanţe cu o natură chimică asemănătoare. Dacă antigenul este proteic, el trebuie eliberat de toate substanţele neproteice prezente în extractul brut (săruri minerale, acizi organici, aminoacizi, glucide, acizi nucleici etc.), cît şi de substanţele proteice care se găsesc în materialul biologic supus extracţiei, alături de proteina dată. La purificarea polizaharidelor trebuie îndepărtate în special proteinele însoţitoare, care pot conferi o antigenicitate aparentă polizaharidului respectiv.

În general, la cercetări imunochimice poate fi mai degrabă tolerată prezenţa unor substanţe de altă natură ca antigenul, decît a celor asemănătoare care, injectate la animale, vor intra în competiţie cu antigenul cercetat, stînjenind formarea anticorpilor specifici. Uneori, impurităţile proteice prezente în preparatul antigenic sînt mai imunogene decît proteina principală. La iepurii imunizaţi cu preparate purificate de ovalbumină sau conalbumină, numai 50% din anticorpii totali sînt îndreptaţi faţă de proteina principală, restul fiind îndreptaţi faţă de impurităţile neidentificate, prezente în cantităţi foarte mici (25) (141). Aceste experienţe arată că gradul de purificare a antigenelor destinate cercetărilor imunochimice trebuie să fie foarte avansat.

Eficienţa procedeelor de purificare aplicate amestecului de substanţe se apreciază din variaţia procentuală a antigenului cercetat. Parcurgerea corectă a etapelor de purificare asigură creşterea continuă a procentului de antigen din amestec, ajungîndu-se în cazuri ideale la valori mai mari de 99%. Urmărirea procesului de purificare se face deci măsurînd, prin metode adecvate (electroforeza), procentul de antigen din amestec. Dacă antigenul posedă o activitate enzimatică, se determină activitatea specifică, adică raportul dintre activitatea enzimatică a amestecului şi cantitatea de proteină prezentă în amestec. Examinarea activităţii enzimatice specifice a preparatelor în cursul purificării informează atît asupra mersului purificării, cît şi asupra eficienţei lui. Această posibilitate este exemplificată în tabelul nr. 5.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL NR. 5

Procedeul de purificare a α-amilazei salivare (adaptat după P. Bernfeld, 1955)

Etapa de purificare	Activitatea amilazică* (mg/ml)	Proteină (mg/ml)	Activitatea amilazică specifică	Recuperarea enzimei
Salivă centrifugată	410	3,3	125	—
1. Precipitare cu acetonă 50%	1 620	4,2	385	90
2. Precipitare cu acetonă 70%	1 920	2,9	663	77
3. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 45,5%	3 520	4,1	865	45
4. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 40%	5 720	6,1	940	36
5. Cromatografie peste amberlit IRA-400	6 980	7,3	955	30

* Activitatea amilazică este exprimată în mg maltoză eliberată în 3 min la 20°C de către 1 ml soluție de enzimă.

Pentru purificarea antigenelor se aplică metodele folosite la purificarea proteinelor și polizaharidelor. Nu se poate da o schemă generală de purificare care să se aplice în toate cazurile. Metodele utilizate sînt în funcție de natura particulară a antigenului cercetat și de calitatea și de cantitatea impurităților. De aceea, pentru purificarea unui antigen dat, experimentatorul trebuie să aleagă singur tehnica cea mai eficientă care să permită îndepărtarea rapidă și cît mai completă a impurităților. O purificare în prea multe etape, în afară de faptul că este laborioasă și consumă timp, poate determina pierderi de antigene sau alterarea structurii lor native.

Dintre metodele utilizate în prezent la purificarea proteinelor și polizaharidelor s-au ales acelea care se aplică în mod curent în practica imunochimică și care nu necesită o aparatură specială. Dializa, electrodializa și filtrarea prin gel sînt în general folosite pentru îndepărtarea impurităților micromoleculare cu o natură diferită de a antigenelor, iar precipitarea cu săruri și solvenți organici, cromatografia pe coloană și electroforeza sînt aplicate cu scopul separării antigenelor de impuritățile macromoleculare cu o natură chimică diferită sau asemănătoare. Trebuie avut în vedere faptul că metodele din ultima categorie pot fi întrebuințate nu numai în scop preparativ, ci și în scop analitic, pentru stabilirea gradului de purificare a preparatului antigenic obținut.

Scanned with OKEN Scanner

1. Dializa şi electrodializa

Dializa este metoda de îndepărtare a substanţelor micromoleculare dintr-un amestec prin difuziunea lor printr-o membrană, sub acţiunea unui gradient de concentraţie. Fiind un fenomen de difuziune, dializa se încadrează în legea lui Fick:

$$\frac{ds}{dt} = -D\frac{dc}{dx},$$

unde s = cantitatea de substanţă difuzată prin membrană; t = timpul de dializă; c = concentraţia soluţiei care dializează; x = distanţa în sensul difuziunii; D = coeficientul de difuziune.

Integrînd expresia de mai sus, se obţine relaţia:

$$s = \mathrm{KAt}\ (c_o - c_i),$$

unde K = constanta caracteristică pentru membrana şi soluţia utilizată; A = suprafaţa membranei; c_o şi c_i = concentraţiile substanţei de o parte şi de alta a membranei; t = timpul de dializă.

Din examinarea relaţiei de mai sus, rezultă că viteza cu care se îndepărtează dintr-un amestec substanţele micromoleculare depinde de suprafaţa membranei, timpul de dializă şi diferenţa lor de concentraţie de o parte şi de alta a membranei.

Membrana. Elementul principal în dializă îl constituie membrana semipermeabilă care lasă să difuzeze prin ea numai substanţele cu greutate moleculară şi dimensiuni mici, reţinînd în schimb moleculele cu dimensiuni şi greutate moleculară mare. Materialele cele mai utilizate pentru prepararea membranei de dializă sînt colodiul şi celofanul.

Din colodiu se pot prepara în laborator membrane cu diferite grade de porozitate (vezi anexa II).

Celofanul constituie un material foarte mult întrebuinţat pentru dializă. Grosimea şi porozitatea celofanului din comerţ permite trecerea unor substanţe cu greutate moleculară de cel mult 8 000—10 000. Deci, proteinele şi polizaharidele, chiar cele cu dimensiuni mai mici, nu trec prin celofan. Porozitatea celofanului poate fi mărită prin diferite tratamente. (28) (vezi anexa II). În acest fel se poate realiza o gradare a porozităţii, care să permită îndepărtarea substanţelor cu greutate moleculară mai mare de 10 000 (59).

Înainte de întrebuinţare trebuie verificată etanşeitatea membranelor semipermeabile cu o soluţie de albastru de metilen.

Principii de funcţionare. Cel mai simplu dializor se construieşte dintr-un sac de celofan de dimensiuni mici, fixat de o eprubetă cu inele de cauciuc sau aţă. Soluţia destinată dializei nu trebuie să ocupe mai mult de 2/3 din volumul sacului. Acesta se introduce într-un vas cu apă, ast-

Scanned with OKEN Scanner

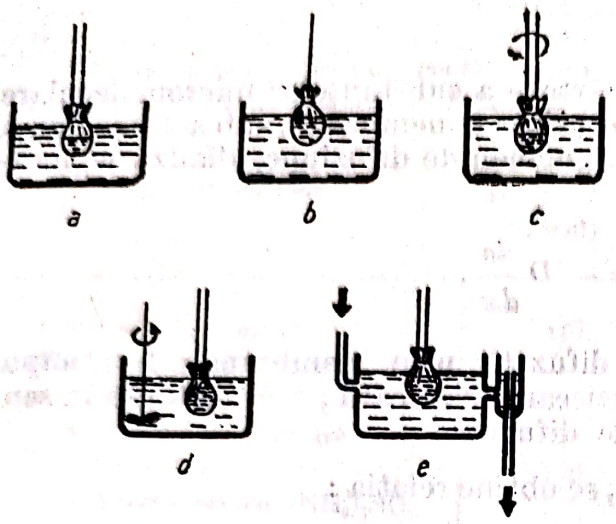


Fig. 6.—Principalele tipuri de dializoare. *a*, Dializa simplă; *b*, dializa la volum constant; *c*, dializa cu agitarea sacului; *d*, dializa cu agitarea lichidului exterior; *e*, dializa în curent continuu.

fel ca nivelul soluției care dializează să fie cu cîțiva milimetri deasupra nivelului apei.

Dacă soluția pentru dializă este puternic impurificată cu săruri, datorită diferenței de presiune osmotică în sac intră cantități însemnate de apă care diluează soluția. Pentru a evita acest inconvenient se efectuează dializa la volum constant, adică sacul de celofan, plin cu soluția de dializat, se leagă ca o pungă, fără intermediul eprubetei.

Creșterea vitezei de dializă se realizează prin două procedee, care pot fi folosite separat sau simultan: *a*) agitarea sacului de celofan prin fixarea lui la un motor cu turație mică sau agitarea lichidului din vasul de dializă; *b*) schimbarea în mod continuu a lichidului față de care se face dializa, cu ajutorul unui sistem care permite introducerea și evacuarea continuă a lichidului în ritmul dorit.

Cantitatea de lichid față de care se face dializa trebuie să fie cel puțin 10—12 ori mai mare decît volumul soluției dializate. Dacă nu se folosește sistemul de schimbare continuă a lichidului, el trebuie înlocuit periodic, mai des la începutul dializei decît către sfîrșitul acesteia. Dializa se poate face după necesități, nu numai față de apă distilată, ci și față de diferite soluții tampon, soluție salină fiziologică etc. Viteza de dializă este mai mare la începutul experiențelor, datorită diferențelor mai mari de concentrație existente de o parte și de alta a membranei. Controlul terminării dializei se poate face conductometric, colorimetric sau prin metode analitice specifice substanței care s-a dializat. Temperatura la care se efectuează dializa trebuie să fie cît mai scăzută posibil, de aceea, în mod obișnuit aparatele se montează în frigider.

În figura 6 sînt ilustrate tipuri de dializoare folosite curent.

Tipuri de dializoare. Un dializor eficace, care permite dializa unor cantități relativ mici de extracte, la rece, într-un interval de timp scurt, este prezentat mai jos (82), (fig. 7).

Tubul de celofan se fixează cu ajutorul unei legături de ață sau tifon de o eprubetă umplută cu apă. În spațiul dintre celofan și eprubetă se toarnă soluția supusă dializei (10—20 ml) și se face o a doua legătură la o mică distanță, deasupra nivelului de lichid. Tubul de dializă se introduce apoi în ramura mai largă a unui tub de sticlă în formă de U, care este menținut în poziție verticală în vasul colector cu ajutorul unui stativ de

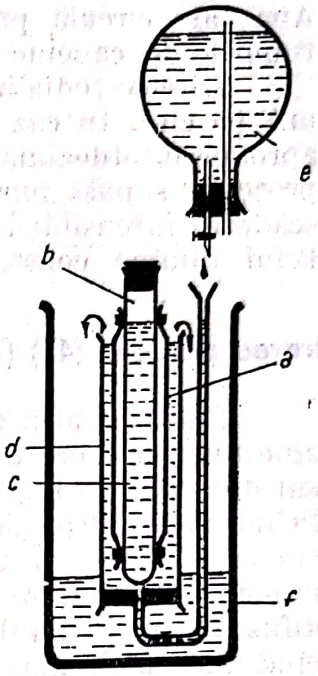


Fig. 7. — Dializor rapid cu curent continuu de lichid.
a, Tub din celofan; *b*, eprubetă umplută cu apă; *c*, soluție de dializat; *d*, tub cu apă; *e*, balon de alimentare cu apă; *f*, vas colector (după G. A. Kritski, 1950).

aluminiu. Deasupra acestui vas se fixează un balon de alimentare (1—2 l), din care se scurge apa picătură cu picătură în ramura subțire a tubului în formă de U. Apa care deversează tubul se adună la fundul vasului colector. În acest aparat, circulînd 1—2 l de apă, în 3—5 ore se dializează complet o soluție 50% de sulfat de amoniu.

Electrodializa. O perfecționare importantă a tehnicii de dializă constă în efectuarea ei într-un cîmp electric. Cîmpul electric accelerează trecerea ionilor și a micromoleculelor încărcate electric prin membrane, ceea ce scurtează considerabil procesul de purificare. Se cunosc foarte multe aparate de electrodializă; dintre acestea, mai folosit este tipul Brintzinger (fig. 8).

Aparatul se compune dintr-un vas exterior prin care circulă apa. În acest vas se introduc două vase concentrice, confecționate din vergele de sticlă, pe care se montează două membrane de celofan. Spațiul cuprins între cele două membrane se umple cu soluția care trebuie dializată. În vasul interior de celofan se asigură de asemenea circulația apei. Electrozii sînt de platină, fiind plasați în vasul exterior (catodul) și în vasul interior de celofan (anodul). Vasul intermediar, care conține soluția de dializat, se rotește cu ajutorul unui motor.

Acest aparat poate fi folosit și pentru dializa obișnuită; el posedă atît agitare mecanică, cît și curent continuu de lichid, de aceea, asigură o eliminare rapidă a electroliților chiar în absența curentului electric. Aparatul are două dezavantaje principale: necesită volume prea mari de lichid de dializat (cel puțin 50 ml) și nu este prevăzut cu răcire. Se pot lua măsuri de corectare a acestor defecte, construind în laborator aparate cu dimensiuni mai mici și asigurînd răcirea vasului exterior printr-o baie de gheață.

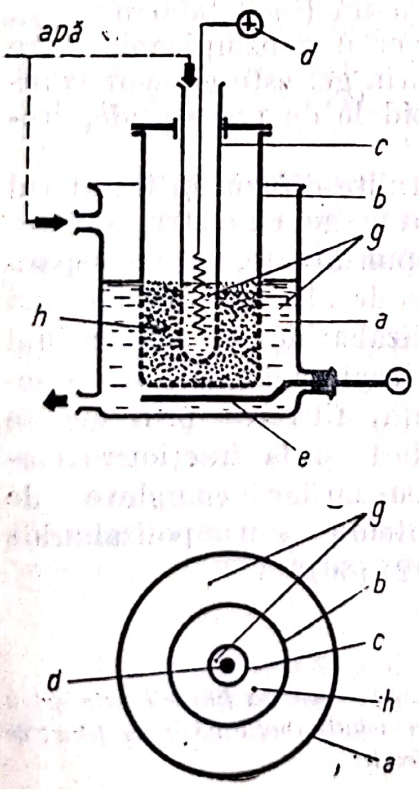


Fig. 8. — Schema electrodializorului tip Brintzinger (secțiune longitudinală — sus; secțiune transversală — jos).
a, Vas exterior; *b*, vas intermediar cu celofan; *c*, vas interior cu celofan; *d*, anod; *e*, catod; *g*, apă circulantă; *h*, soluția de dializat.

Apa care circulă prin dializor poate fi de asemenea răcită dacă se trec tuburile de cauciuc aductoare printr-o baie de gheaţă.

La electrodializă nu se admite o densitate de curent mai mare de 10 mA pe cm². În caz contrar are loc o încălzire puternică a lichidului şi aproape întotdeauna o schimbare a pH-ului, care poate provoca alterarea proteinei supusă purificării. Mersul electrodializei se urmăreşte observînd scăderea intensităţii curentului. La sfîrşitul operaţiei, intensitatea curentului rămîne constantă.

2. Filtrarea prin gel (47) (111)

Filtrarea prin gel este o metodă de separare a substanţelor dintr-un amestec prin trecerea lor peste un strat de gel. Gelul încetineşte deplasarea substanţelor, în raport cu dimensiunile lor moleculare, ceea ce face ca în lichidul care filtrează să apară pe rînd diferite componente ale amestecului supus purificării. Întîi apar moleculele cu dimensiuni mari şi apoi cele cu dimensiuni mici. Această comportare se explică astfel : moleculele mici difuzează în lichidul din interiorul particulelor care alcătuiesc gelul, pe cînd moleculele mari, neputînd intra, trec în lichidul ce înconjură particulele, înaintînd liber o dată cu lichidul care curge prin stratul de gel. De aceea, moleculele mari vor traversa stratul de gel cu o viteză mai mare decît moleculele mici, a căror mişcare este încetinită de difuzia lor în interiorul particulelor gelului (fig. 9).

Se pot astfel separa substanţele macromoleculare de cele micromoleculare printr-un fenomen de „cernere" moleculară (*(molecular sieving)*, în care se încetineşte deplasarea componenţilor cu dimensiuni moleculare mai mici. Din acest motiv, procedeul filtrării prin gel este eficient la îndepărtarea micromoleculelor din soluţiile coloidale de polipeptide, proteine şi polizaharide (114) (48).

Gelurile cu particule mai poroase vor permite difuzia în interiorul particulelor şi a moleculelor mai mari ; folosind un gel cu o structură corespunzătoare, se pot separa una de alta şi proteine sau polizaharide cu dimensiuni moleculare diferite. În consecinţă, filtrarea prin gel se aplică şi la fracţionarea amestecurilor complexe de proteine sau polizaharide (112) (60).

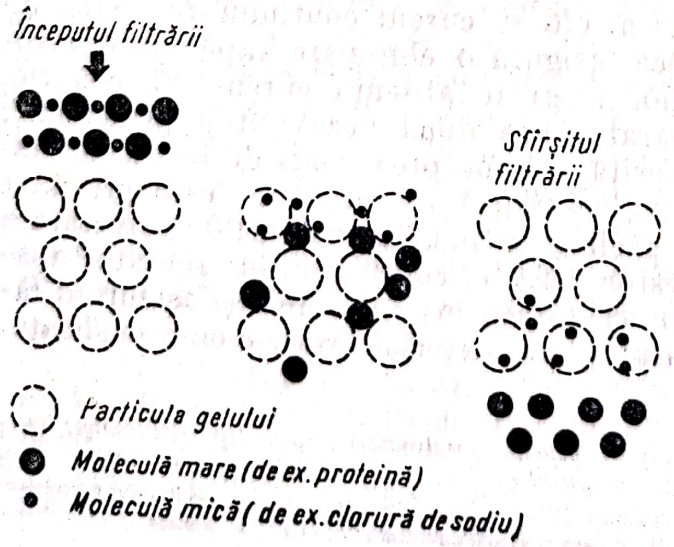


Fig. 9. — Schema filtrării prin gel a unei soluţii conţinînd două feluri de molecule.

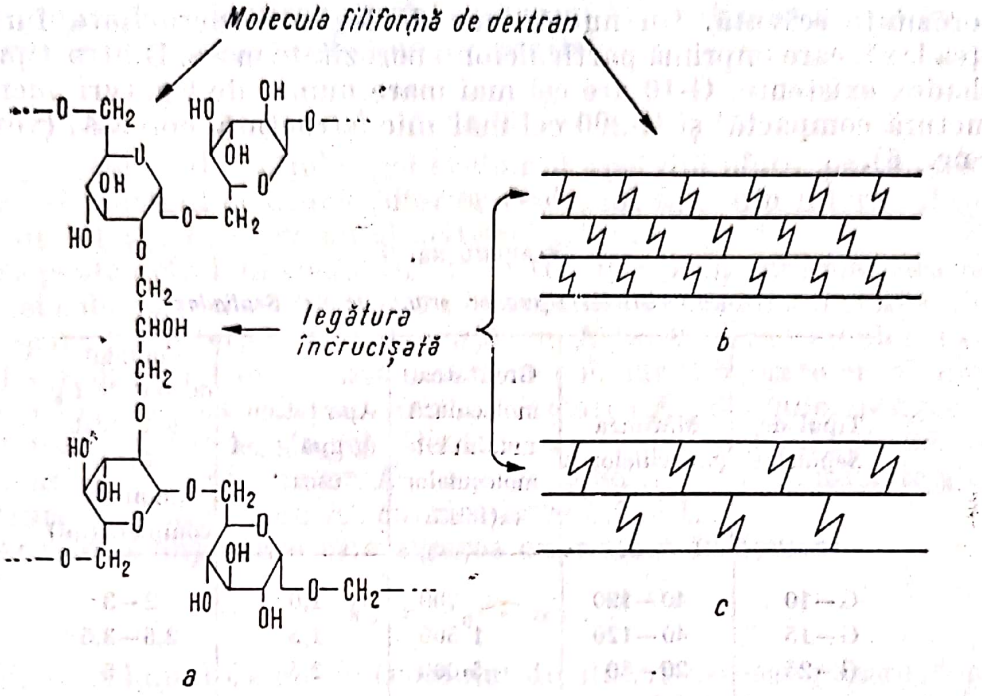


Fig. 10.—Structura gelului de Sephadex. a, Formula chimică; b, rețea strînsă, porozitate scăzută; c, rețea laxă, porozitate mare.

G e l u l. Reuşita filtrării depinde de structura şi proprietăţile fizico-chimice ale gelurilor folosite. În prezent, pe o scară largă, sînt utilizate gelurile pe bază de dextran[1], cunoscute sub denumirea comercială de Sephadex (142) şi cele pe bază de poliacrilamidă, denumite comercial Bio-Gel P (17) (70) (71) (138).

Dintre aceste geluri cea mai largă răspîndire în practica de laborator o au gelurile de dextran.

Sephadexul este o substanţă care se obţine prin combinarea dextranului cu epiclorhidrina ($CH_2 - \underset{O}{CH} - CH_2Cl$), care conduce la formarea de legături încrucişate între macromoleculele filiforme ale dextranului. În acest fel se obţine o reţea tridimensională, formată din lanţuri polizaharidice (fig. 10).

Reţeaua de dextran poate fi mai strînsă sau mai laxă, după numărul de legături încrucişate existente în moleculă. O reţea strînsă se realizează printr-un număr mare de legături încrucişate şi conduce la particule cu

---

[1] Dextranul este un polizaharid al glucozei, care se obţine prin fermentarea zaharozei de către *Leuconostoc mesenteroides*: $n\ C_{12}H_{22}O_{11} \xrightarrow{\text{dextranzaharaza}} (C_6H_{10}O_5)_n + n\ C_6H_{12}O_6$ (zaharoză; dextran; fructoză)

o porozitate scăzută. Un număr mic de legături încrucişate furnizează o reţea laxă, care imprimă particulelor o porozitate mare. Dintre tipurile de Sephadex existente, G-10 are cel mai mare număr de legături încrucişate (structură compactă) şi G-200 cel mai mic (structură poroasă) (vezi tabelul nr. 6).

TABELUL NR. 6

Caracteristicile tipurilor granulate de Sephadex

Tipul de Sephadex	Mărimea particulelor μ	Greutatea moleculară maximă a moleculelor reţinute	Apa reţinută (g apă/g gel uscat)	Volumul ocupat de 1 g gel uscat după îmbibare completă (ml)
G—10	40—120	700	1,0	2—3
G—15	40—120	1 500	1,5	2,5—3,5
G—25	20—80 (fin) 100—300 (grosier)	5 000	2,5	5
G—50	20—80 100—300	10 000	5,0	10
G—75	40—120	50 000	7,5	12—15
G—100	40—120	100 000	10,0	15—20
G—150	40—120	150 000	15,0	20—30
G—200	40—120	200 000	20,0	30—40

La acelaşi grad de porozitate, particulele mai mici dau o separare mai eficientă a substanţelor, însă debitul de curgere este mai mic. Particulele grosiere se întrebuinţează în coloane cu diametrul mare, unde sînt necesare debite de curgere mari.

Porozitatea tipului de gel se exprimă prin valorile apei reţinute. Cu cît porozitatea gelului este mai mare, cu atît cantitatea de apă reţinută este mai mare şi invers, la porozităţi mici gelul va reţine apă mai puţină.

Din cauza numărului mare de grupări hidroxilice, Sephadexul are o hidrofilie pronunţată ; amestecat cu apa sau cu soluţii saline, substanţa se îmbibă rapid, formînd un gel. Gelul format este insolubil în apă şi în soluţii saline. El este stabil într-un interval larg de pH (2-9).

Teoria filtrării prin gel (47) (55). Filtrarea printr-o coloană cromatografică umplută cu gel conduce la separarea substanţelor dintr-un amestec, datorită proprietăţii gelului de a exclude substanţele cu moleculă mare şi de a fi accesibil numai pentru difuzia moleculelor cu dimensiuni mici. Pentru a înţelege circulaţia substanţelor într-o coloană, trebuie avută în

vedere proporţia volumelor. Astfel, volumul total al coloanei de gel (V_t) este compus din următoarele volume parţiale :

$$V_t = V_0 + V_i + V_g,$$

unde V_0 = volumul spaţiului gol (volumul apei din afara particulelor de gel) ; V_i = volumul spaţiului interior (volumul apei din interiorul particulelor de gel) ; şi V_g = volumul matricei gelului.

Se poate defini un coeficient de distribuţie (K_d), care măsoară repartiţia unei substanţe date între apa din volumul spaţiului gol şi apa din volumul spaţiului interior. O substanţă cu $K_d = 0$ este complet exclusă din lichidul din interiorul particulelor de gel, iar substanţe cu K_d cuprins între 0 şi 1 sînt numai parţial excluse. Valoarea K_d depinde, desigur, şi de porozitatea particulelor de gel. Pentru un gel de Sephadex G-25, moleculele mari de proteină au un $K_d = 0$, pe cînd moleculele mici de glucoză sau clorură de sodiu au un K_d cuprins între 0,7 şi 1,0.

Această comportare este riguros exprimată în formula :

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i,$$

unde V_e = volumul de eluţie (volumul de eluant necesar pentru deplasarea unui component oarecare de la suprafaţa stratului superior al coloanei de gel pînă la capătul inferior).

Trecînd printr-o coloană două substanţe, una cu $K_d = 0$ ($V_e = V_0$) şi alta cu $K_d = 1$ ($V_e = V_0 + V_i$), prima va ieşi din coloană după irigarea ei cu un volum V_0, iar ultima numai după irigarea cu un volum suplimentar egal cu V_i. Această comportare este ilustrată în figura 11.

Separarea completă este realizată numai dacă volumul probei supusă analizei (V_p) este mai mic decît V_i (fig. 11, *a*). În caz contrar, cele două substanţe nu pot fi complet separate (fig. 11, *b*).

Alegerea gelului. Această operaţie se face potrivit scopurilor urmărite de experimentator. Conform datelor din tabelul nr. 6, pentru separarea substanţelor cu greutate moleculară mai mică de 5 000 se va întrebuinţa tipul G-25, pentru cele cu greutate moleculară mai mică de 10 000 tipul

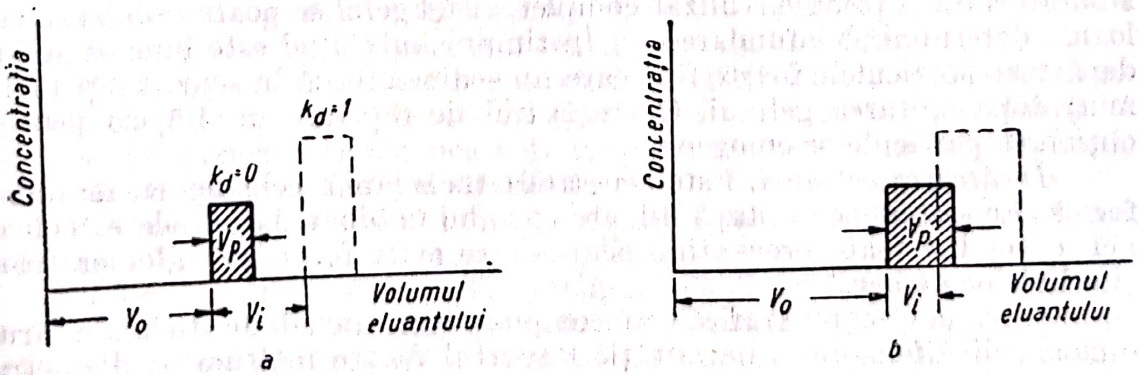


Fig. 11. — Principiul filtrării printr-o coloană de Sephadex. a, V_p mai mic decît V_i ; b, V_p mai mare decît V_i.

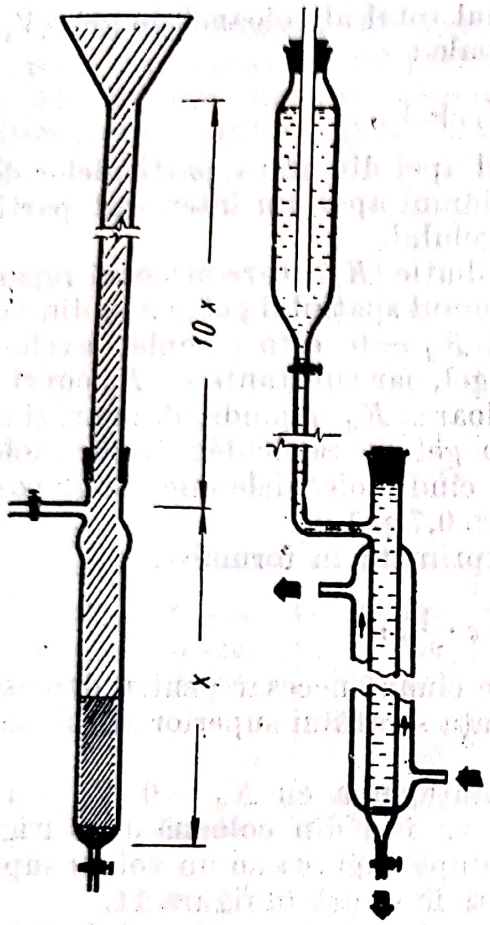


Fig. 12. — Umplerea cu gel şi funcţionarea coloanei cromatografice.

G-50 ş. a. m. d. La alegerea mărimii particulelor se va ţine seama de faptul că gelurile cu particule mici asigură o rezoluţie mai eficientă a substanţelor decît gelurile cu particule mari, dar ultimile permit executarea experienţelor într-un timp mai scurt.

La alegerea tipului de Sephadex, în afară de criteriul greutăţii moleculare, trebuie să se ţină seama şi de posibilitatea adsorbţiei proteinelor pe gel sau de interacţiunea proteină-proteină, care pot determina o filtrare neconcordantă cu greutatea moleculară. Astfel viscotoxina (G. M. = 9 000) filtrată peste Sephadex G-50, în particulele căruia poate intra, este adsorbită şi migrează mai încet decît izoleucina, aminoacid cu greutate moleculară mult mai mică.

Îmbibarea gelului. Înainte de umplerea coloanei de filtrare se îmbibă gelul prin introducerea lui într-un exces de apă. În timpul îmbibării se recomandă agitarea suspensiei, pentru a evita formarea de aglomerate; în acelaşi scop, se adaugă şi clorură de sodiu pînă la realizarea unei concentraţii de 0,1-1%. În locul soluţiei de NaCl mai poate fi folosită şi soluţia tamponului care se va utiliza la determinare. Procesul de imbibiţie decurge rapid, echilibrul atingîndu-se la tipurile G-25 şi G-50 în cîteva ore (maximum 24 de ore). Pentru tipurile G-100 şi G-200, îmbibarea trebuie să dureze mai mult, minimum 48 de ore. Procesul are loc la temperatura laboratorului şi trebuie realizat complet, altfel gelul se poate îmbiba în coloană, determinînd înfundarea ei. În timpul imbibiţiei este bine să se îndepărteze particulele foarte fine care nu sedimentează în scurt timp (5-10 min) după agitarea gelului. Operaţia trebuie repetată de 4-5 ori pentru obţinerea particulelor omogene.

Încărcarea coloanei. Este necesară o încărcare a coloanei cît mai uniformă. Ea se realizează după diluarea gelului îmbibat. La umplerea coloanei se vor lua toate precauţiile pentru a se evita formarea aglomeratelor şi a bulelor de aer.

Coloana cromatografică este compusă dintr-un tub de sticlă ale cărui dimensiuni diferă după necesităţi. Raportul dintre înălţime şi diametru are în mod obişnuit valori cuprinse între 10/1 şi 20/1. La fundul coloanei se fixează un strat de vată de sticlă (fig. 12).

Scanned with OKEN Scanner

Se umple coloana cu apă (sau tampon) la temperatura camerei. Printr-o pîlnie fixată la coloană se adaugă apoi suspensia de gel, care sedimentează încet. După formarea unui strat de 2-5 cm, se deschide cu precauţie robinetul şi se lasă să curgă lichidul cu un debit mic. Operaţia continuă pînă la umplerea coloanei cu cantitatea de gel dorită. Ultimul strat de gel din coloană trebuie să fie perfect orizontal. Peste el se adaugă o hîrtie de filtru circulară, pentru a preveni tulburarea stratului superior la adăugarea probei. Cînd coloana este umplută, se îndepărtează pîlnia şi se conectează rezervorul cu apă (sau tampon). Stratul de gel se stabilizează prin spălarea lui peste noapte.

Introducerea probei. Amestecul de substanţe supus purificării trebuie să îndeplinească două condiţii : *a*) să fie cuprins într-un volum cît mai mic posibil, pentru a permite separarea completă a componenţilor (vezi teoria filtrării) (de ex. pentru desalifierea completă a unei soluţii proteice trebuie folosit un volum mai mic de 1/3 din volumul total al coloanei) ; *b*) să nu aibă o viscozitate prea mare, deoarece aceasta limitează concentraţia soluţiilor de proteine şi polizaharide care pot fi utilizate.

Pentru introducerea probei în coloană se procedează în felul următor : se îndepărtează stratul de lichid de deasupra gelului şi apoi se adaugă proba cu o pipetă capilară. Se deschide robinetul de curgere al coloanei şi proba pătrunde în stratul de gel. Se închide robinetul. Se adaugă apoi în 3 reprize volume mici de eluant (apă sau tampon), pentru spălare. Se lasă să intre pe rînd aceste volume în gel, manevrînd robinetul. În final se adaugă un volum mai mare şi se face legătura între coloană şi rezervorul de eluant, avînd grijă să se asigure o coloană continuă de lichid (fără bule de aer). Se deschide robinetul de curgere şi se porneşte eluţia.

Eluţia. Eluantul se alege în funcţie de natura chimică a substanţelor de analizat şi de scopurile cercetării. Se pot folosi apa distilată, soluţia salină fiziologică şi soluţii tampon. O trăsătură caracteristică a metodei de filtrare prin gel este aceea că *toate substanţele prezente în proba supusă filtrării sînt eluate fără schimbarea eluantului.*

Viteza de eluţie variază în funcţie de tipul de Sephadex folosit şi de dimensiunile coloanei. Gelurile, ale căror particule au dimensiuni mici, determină o viteză de curgere mai mică, dar o putere de rezoluţie mai mare, de aceea ele sînt preferate în experienţele de laborator. Dacă se folosesc totuşi geluri grosiere, este necesară reglarea vitezei de curgere.

Eluţia trebuie efectuată sub o presiune constantă, care se realizează în mod obişnuit prin diferenţa de nivel dintre rezervorul cu eluant şi coloană. În cazuri speciale, poate fi folosită şi o presiune mai ridicată, realizată cu ajutorul unei bombe de azot.

Filtrarea prin gel se face în mod obişnuit la temperatura laboratorului, chiar cînd se lucrează cu substanţe proteice.

Separarea substanţelor este proporţională cu înălţimea stratului de gel. Pentru a evita întrebuinţarea coloanelor prea lungi, se poate aplica un procedeu de trecere succesivă şi continuă a eluantului peste coloana de gel. El trece de atîtea ori pînă se realizează separarea completă a substanţelor (113).

Scanned with OKEN Scanner

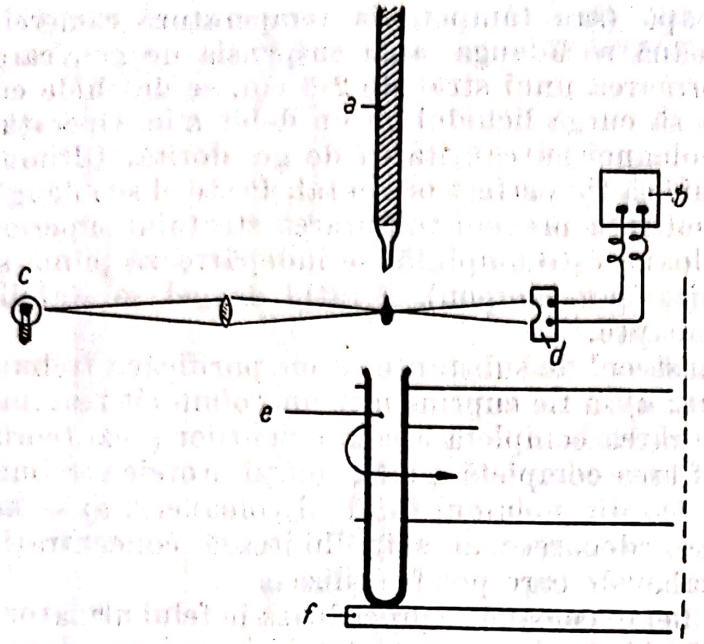


Fig. 13. — Schema unui colector de fracţiuni. a, Coloană; b, numărător de picături; c, sursă de lumină; d, celulă; e, eprubetă colectoare; f, masă rotundă.

Colectarea şi examinarea fracţiunilor. Eluantul care se scurge din coloană se colectează în volume egale. Mărimea acestor volume depinde de viteza de curgere. De exemplu, pentru o viteză de curgere de 6,3 ml pe oră, volumul fracţiunilor colectate a fost de 1 ml (111), iar pentru o viteză de curgere de 40 ml pe oră s-au colectat volume de 7 ml (106).

Trebuie să se colecteze un număr mare de fracţiuni ale căror volume să fie precis măsurate. Efectuarea acestor operaţii se realizează de obicei cu un colector automat de fracţiuni. Aparatul este compus dintr-o masă rotundă pe circumferinţa căreia sînt aşezate o serie de eprubete. Coloana cromatografică este fixată deasupra acestor eprubete. După scurgerea unei cantităţi de eluat din coloană, masa se roteşte şi filtratul începe să se scurgă în eprubeta vecină. Măsurarea precisă a volumului se face cu ajutorul unei instalaţii speciale, numărătorul de picături. Fiecare picătură care se scurge întrerupe pentru scurt timp un flux luminos. Întreruperea este transmisă de o celulă fotoelectrică la numărătorul de picături sub forma unui impuls electric. După un anumit număr de impulsuri, corespunzător unui anumit număr de picături, numărătorul comandă prin intermediul unui releu un motor care roteşte masa, aducînd sub coloană eprubeta următoare (fig. 13).

Colectarea la volum constant poate fi asigurată şi prin măsurarea volumelor de eluat care se scurg din coloană cu ajutorul unui dispozitiv de sifonare, prevăzut cu un contact de mercur. Pe lîngă dispozitivele automate, bazate pe colectarea fracţiunilor la volum constant, s-au construit şi dispozitive pentru colectarea fracţiunilor la greutate constantă sau la intervale egale de timp. Ultimul tip de colector se poate folosi numai dacă eluatul se scurge constant din coloană, altfel volumele fracţiunilor nu sînt egale. Există aparate în care sînt îmbinate diferite posibilităţi de colectare : fie la volum constant, fie la intervale egale de timp etc.

Substanţele din fracţiunile colectate sînt detectate şi dozate prin metode chimice sau fizico-chimice. Ultimele sînt preferabile, deoarece nu fac inutilizabile substanţele separate. Astfel, substanţele proteice se pun în evidenţă prin spectrofotometrie în UV, la 280 mμ polipeptidele colori-

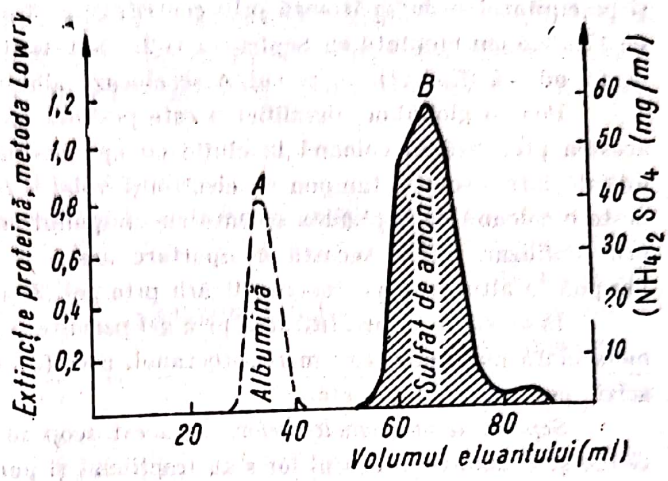


Fig. 14. — Curbele de developare obținute prin filtrarea unui amestec de albumină serică și sulfat de amoniu (după J. Forath și colab., 1959).

metric prin reacția cu ninhidrină (cu alterarea substanțelor separate), enzimele prin măsurarea acțiunii asupra substratului specific, sărurile conductometric sau prin dozare chimică etc.

După determinarea concentrației substanțelor în fiecare fracțiune colectată, se trasează curbele de developare, înscriindu-se pe ordonată concentrația substanțelor eluate și pe abscisă volumul lichidului trecut prin coloană (fig. 44). Curbele de developare sînt cu atît mai exacte, cu cît se colectează fracțiunile în volume mai mici.

După stabilirea curbelor de developare pentru un amestec dat, se poate trece la izolarea fiecărui component prin colectarea lui într-o singură probă. Astfel, în exemplul din figura 14, albumina serică se separă colectînd eluatul între 30 și 44 ml, iar sulfatul de amoniu între 55 și 75 ml.

În urma filtrării, substanțele izolate se găsesc într-un volum mai mare de eluant decît cel inițial, de aceea ele trebuie concentrate.

Regenerarea coloanei de gel. Cînd ultimele urme din amestecul supus purificării s-au scurs din coloană, ea este gata pentru o nouă determinare. O coloană cu gel de Sephadex poate fi întrebuințată de foarte multe ori (cîteva sute de ori). Totuși, în urma unei întrebuințări îndelungate are loc o îmbîcsire a coloanei, datorită suspensiilor fine din proba supusă filtrării. În aceste cazuri, se scoate gelul din coloană, se spală sub agitare cu apă sau tampon și se lasă un timp scurt pentru depunerea particulelor; se îndepărtează particulele nedepuse. Se repetă operația de cîteva ori, după care gelul se introduce din nou în coloană.

Gelurile de Sephadex îmbibate pot fi sterilizate la autoclav la 110°C timp de 40 min, fără modificarea proprietăților caracteristice. Pentru a evita dezvoltarea microorganismelor în coloanele umplute și neîntrebuințate mai mult timp, este indicat să se adauge substanțe conservante, ca: toluen, fenol sau soluția folosită la filtrare, saturată cu cloroform. Dacă se lucrează cu tamponul tris, nu mai sînt necesare substanțe conservante deoarece acesta are activitate bactericidă.

Aplicații. Desalifierea (114) (124). Separarea rapidă de proteine și de polizaharide a sărurilor și a altor molecule mici este una din întrebuințările majore ale filtrării prin gel. De exemplu, se adaugă 5 ml soluție saturată de sulfat de amoniu la 5 ml ser sanguin uman proaspăt

Scanned with OKEN Scanner

și precipitatul se îndepărtează prin centrifugare. 3 ml de supernatant se aplică într-o coloană de 17,5/2,5 cm umplută cu Sephadex G-25. Substanțele se eluează cu apă distilată la un debit de 25 ml/oră (fig. 14). În piscul *A* se eluează albumina, iar în piscul *B* sulfatul de amoniu.

Pentru globuline, desalifierea este posibilă numai printr-un procedeu indirect, deoarece acestea precipită în coloană la eluție cu apă distilată. Proteina este transferată din soluția inițială într-o soluție tampon cu electroliți volatili (amoniac, trietanolamină), prin trecerea ei peste o coloană de Sephadex spălată cu tamponul volatil. Sarea volatilă este apoi îndepărtată prin liofilizare (48). Această comportare arată că soluțiile proteice pot fi trecute dintr-un tampon în altul prin procedeul filtrării prin gel (89).

În afară de săruri, filtrarea prin gel permite și îndepărtarea altor componenți cu greutate moleculară mai mare, ca : mercaptoetanol, uree (6), coloranți fluorescenți (137) (126), aminoacizi, peptide (112 (7) etc.

Separarea macromoleculelor. În acest scop se folosesc în special tipurile de Sephadex G-100 și G-200. Cu ajutorul lor s-au fracționat și purificat proteinele plasmatice (79) (56) (50), enzimele (128) (83), polizaharidele (60) (103) și acizii nucleici (17).

3. Cromatografia pe schimbători de ioni

Principiul (108). Prin introducerea proteinelor sau a polizaharidelor într-o coloană cromatografică umplută cu schimbători de ioni, se stabilesc multiple legături electrostatice între sarcinile electrice ale macromoleculelor și sarcinile opuse ale suprafeței schimbătorilor. Coloana este apoi eluată cu un ion competitiv care, avînd o afinitate mai mare pentru schimătorul de ioni, desface și înlocuiește macromolecula de pe suprafața acestuia, determinînd eluția ei. Concentrația ionilor competitivi necesari pentru eluție depinde de numărul legăturilor care se stabilesc între proteine și schimbători. De aceea, două proteine, cu încărcare electrică diferită sau cu o distribuție diferită a sarcinilor în molecula lor, vor necesita și concentrații diferite din substanțele cu care se va face eluția ; pe această bază se poate realiza separarea lor una de cealaltă.

Eluția diferențială se poate efectua nu numai prin desfacerea legăturii dintre proteine și schimbătorul de ioni (realizată prin creșterea concentrației sărurilor din eluant), ci și prin reducerea numărului de sarcini electrice din molecula proteică, operație care se realizează prin schimbări corespunzătoare de pH.

Calea experimentală pentru desprinderea succesivă a macromoleculelor de pe suprafața schimbătorului de ioni depinde de natura macromoleculei cercetate.

Tipuri de schimbători. După comportarea lor în procesele de schimb ionic, substanțele schimbătoare de ioni se împart în două categorii : *a) cationiți*, schimbători de ioni cu proprietăți acide. Se disting cationiți puternic acizi, cu gruparea liberă $-SO_3^-$ și slab acizi, cu gruparea liberă $-COO^-$; *b) anioniți*, schimbători de ioni cu proprietăți bazice. Se disting anioniți puternic bazici ($-N^+R_3$) sau slab bazici ($-N^+HR_2$).

După natura substanțelor pe care sînt grefate grupările active, schimbătorii se împart în trei categorii principale : a) schimbători de ioni pe bază de polistiren sau acid polimetaacrilic (rășini schimbătoare de ioni),

b) schimbători de ioni pe bază de celuloză (cunoscuţi uneori şi sub denumirea de Cellex), c) schimbători de ioni pe bază de dextran (Sephadex).

Schimbătorii de ioni folosiţi cu precădere în cromatografia proteinelor sînt redaţi în tabelul nr. 7.

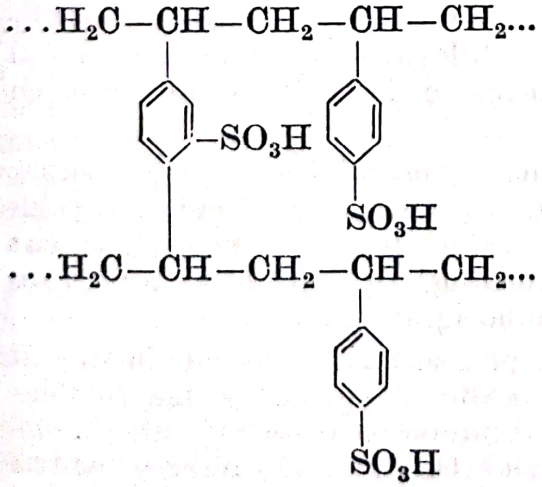
TABELUL NR. 7

Schimbători de ioni folosiţi în cromatografia proteinelor

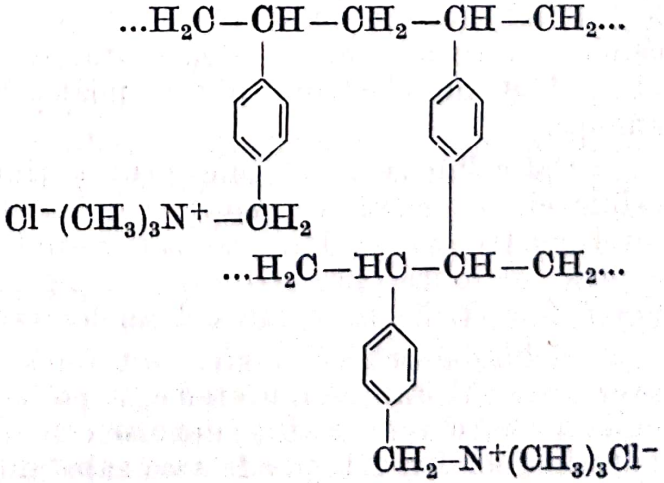
Schimbătorul de ioni *	Scheletul moleculei	Gruparea funcţională	Capacitatea de schimb (meq/g)
Cationiţi			
Dowex-50 (X2, X4) **	Polistiren	$-SO_3^-$	5,0 — 9,2
Amberlit IRC-50 (XE-64)	Acid poli-metaacrilic	$-COO^-$	10,0
SE-Celuloză	Celuloză	$-O-C_2H_4-SO_3^-$	0,2
CM-Celuloză	Celuloză	$-O-CH_2-COO^-$	0,6
SE-Sephadex	Dextran	$-O-C_2H_4-SO_3^-$	4 — 5
CM-Sephadex	Dextran	$-O-CH_2-COO^-$	2 — 2,5
Anioniţi			
Dowex-2 (X10, X8, X4)	Polistiren	$-N^+(CH_3)_2-C_2H_4OH$	3,0 — 3,2
Amberlit IRA-400	Polistiren	$-N^+(CH_3)_3$	2,5
DEAE — Celuloză	Celuloză	$-O-C_2H_4-N^+H(C_2H_5)_2$	0,8 — 1,0
TEAE-Celuloză	Celuloză	$-O-C_2H_4-N^+(C_2H_5)_3$	0,5
ECTEOLA-Celuloză	Celuloză	Amină nedefinită	0,3 — 0,5
DEAE-Sephadex	Dextran	$-O-C_2H_4-N^+H(C_2H_5)_2$	3 — 4

* CM = carboximetil, SE = sulfoetil, DEAE = dietilaminoetil TEAE = trietilaminoetil, ECTEOLA = epiclorhidrină + trietanolamină. ** Simbolul X indică procentul divinilbenzenului în copolimer, în greutate.

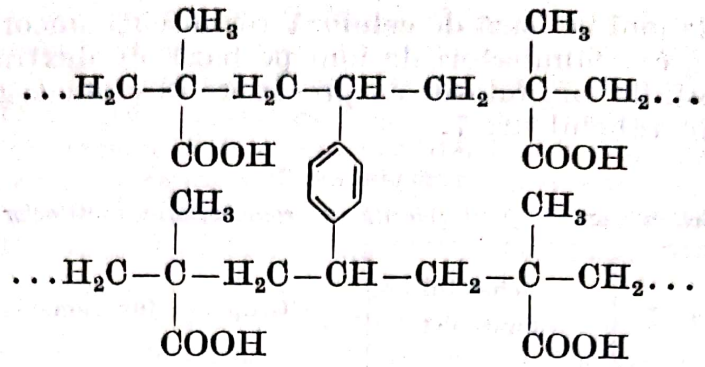
Răşini schimbătoare. Aceste substanţe se obţin prin copolimerizarea stirenului sau a acidului metaacrilic cu un agent de legare încrucişată, divinilbenzenul. Se obţin materiale cu o reţea tridimensională.



Dowex-50



Amberlit IRA-400



Amberlit IRC-50

Schimbătorii de ioni pe bază de acid polimetaacrilic (Amberlit IRC-50), avînd grupări carboxilice libere, sînt cationiţi slab acizi. Răşinile polistirenice pot deveni cationiţi puternic acizi prin sulfonare ($-HSO_3^-$) sau anioniţi puternic bazici prin introducerea grupărilor $-N^+(CH_3)_3$.

Dintre răşinile schimbătoare de ioni amintite în tabelul nr. 7 cea mai folosită la purificarea şi separarea proteinelor este Amberlitul IRC-50(XE-64). Această răşină a fost folosită la purificarea citocromului c (93), ribonucleazei, lizozimului şi chimotripsinogenului (68) (69), trombinei (119), insulinei (26) (96), precum şi la separarea histonelor (29) şi carboxihemoglobinei (12).

Dowex-50 a fost aplicat la purificarea proteinelor din albuşul de ou (130), Dowex-2 s-a folosit la separarea proteinelor serice (15), iar Amberlitul IRA-400 a fost în special întrebuinţat la desalifierea soluţiilor proteice.

Schimbători celulozici. Conţinînd gruparea —OH în moleculă,celuloza manifestă proprietăţi slabe de schimb ionic. Prin introducerea de grupe polare în macromolecula celulozei, capacitatea de schimb poate fi mult mărită. Condensarea celulozei, în mediu puternic alcalin, cu clorhidratul 2-clorotrietilaminei, conduce la DEAE-celuloză. Substituirile hidrogenilor mobili ai funcţiilor alcoolice se fac neregulat, de aceea DEAE-celuloza este mai puţin organizată decît celuloza. Atomul de azot, avînd un dublet de electroni liberi, poate forma o legătură semipolară cu anionii.

CM-celuloza se obţine prin acţiunea acidului cloroacetic asupra celulozei. Numărul de grupări ionizabile prezente în molecula CM-celulozei nu trebuie să depăşească o anumită limită (0,4—0,5 meq/g). În caz contrar se obţin produşi care devin gelatinoşi în contact cu apa şi nu pot fi folosiţi la umplerea coloanelor cromatografice.

Schimbătorii celulozici sînt folosiţi pe scară largă la purificarea şi separarea substanţelor proteice, a polizaharidelor şi a altor macromolecule. În tabelul nr. 8 sînt cuprinse cele mai importante aplicaţii ale schimbătorilor celulozici la purificarea substanţelor care prezintă interes pentru analiza imunochimică.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL NR. 8

Aplicațiile principale ale schimbătorilor de ioni celulozici

Substanța supusă cromatografierii	Tipul schimbătorului de ioni	Indicație bibliografică
Albumină serică	DEAE, CM	S. Cohen, 1959; J. Rejnek și colab., 1963
Anticorpi	DEAE	R. J. Speer și colab., 1959
Anticorpi hidrolizați cu papaină	CM	E. Helmreich și colab., 1961
Anticorpi fluorescenți	DEAE	H. D. Mc. Devitt și colab., 1963
Bacteriofag	ECTEOLA	E. H. Creaser și colab., 1957
Complement	DEAE	H. J. Müller-Eberhard și colab., 1963
γ-globulina serică	DEAE	J. L. Fahey și colab., 1959
Globuline serice	CM, DEAE	H. F. Deutsch și colab., 1961
Peptide	DEAE, ECTEOLA	S. Yanari și colab., 1960
Polizaharide	DEAE	H. Heukon și colab., 1960
Proteine vegetale (fitaglutinine)	DEAE	D. A. Rigas și colab., 1964
Proteine serice	CM	M. P. Tombs și colab., 1961
	DEAE	H. A. Sober și colab., 1956, G. Biserte și colab., 1961
Virusul mozaicului tutunului	ECTEOLA	P. von Tavel, 1959
	DEAE	B. Commoner și colab., 1958
	CM	G. W. Cochran și colab., 1957

Schimbători Sephadex (115). Gelurile de dextran pot fi dotate cu proprietăți schimbătoare, dacă se introduc în molecula lor grupări ionice. Întocmai ca la schimbătorii celulozici, grupările cele mai favorabile sînt DEAE și CM. Produșii obținuți (DEAE-Sephadex și CM-Sephadex), deși cu o mare capacitate de fixare (3—4 meq/g), au o adsorbție nespecifică mică. Ca și gelurile de dextran, schimbătorii Sephadex au o mare afinitate pentru apă, fiind totodată insolubili în apă și soluții saline. Sînt destul de stabili în soluții alcaline și slab acide.

DEAE-Sephadex-ul se găsește în două grade de porozitate, A-25 și A-50 . Tipul A-25 are o rețea mai strînsă, de aceea este folosit pentru fixarea moleculelor mai mici de 10 000, pe cînd A-50, avînd rețeaua mai laxă, este accesibil pentru molecule mai mari (proteine, polizaharide etc.).

DEAE-Sephadex-ul a fost aplicat la fracționarea proteinelor plasmatice umane (56), la fracționarea anticorpilor (72), la separarea de aminoacizi a peptidelor mici (19), la fracționarea mucopolizaharidelor acide (127) etc.

Scanned with OKEN Scanner

CM-Sephadex-ul este livrat de asemenea în două grade de porozitate, C-25 şi C-50, care rezultă ca şi DEAE-Sephadex-ul prin introducerea grupărilor active în Sephadex-ul G-25 şi G-50. Pentru cromatografierea macromoleculelor este recomandabilă folosirea tipului C-50.

CM-Sephadex-ul a fost mai puţin aplicat pînă în prezent, arătînd eficienţă la separarea β şi γ-globulinelor la pH 5,5 (143), la izolarea proteinelor Bence-Jones (42), a polipeptidelor (8) etc.

Caracterizarea schimbătorilor. Principala caracteristică pe care experimentatorul trebuie să o determine la schimbătorul cu care lucrează este *capacitatea de schimb* (exprimată în miliechivalenţi (meq) la 1 g schimbător uscat). În mod curent, capacitatea de schimb trebuie determinată la toţi schimbătorii celulozici, deoarece aceştia fiind puşi în comerţ de firme producătoare diferite, au capacităţi de schimb diferite.

Pentru determinarea capacităţii de schimb se procedează astfel: se cîntăresc exact 2 g din schimbătorul celulozic uscat 10 ore la 60°C. Dacă este anionit, se spală pe o pîlnie Büchner cu 50 ml NaOH 0,5 N şi apoi cu apă deionizată pînă la reacţia neutră a apei de spălare. Se trece apoi cantitativ schimbătorul de ioni într-un pahar Berzelius, se adaugă 25 ml NaCl 1 N şi se titrează cu HCl 0,1 N pînă la pH 3, folosind un electrod de sticlă. Cationiţii se spală pe o pîlnie Büchner cu 50 ml HCl 0,5 N şi apoi cu apă deionizată pînă la reacţie neutră. Se trec apoi într-un pahar Berzelius, se adaugă NaCl 1 N şi se titrează cu NaOH 0,1 N pînă la pH 10, folosind un electrod de sticlă. Cantităţile de acid clorhidric, respectiv hidroxid de sodiu, adăugate pentru atingerea pH-ului de 3, respectiv 10, exprimate în miliechivalenţi şi împărţite la 2 (s-au luat 2 g de schimbători în analiză), reprezintă capacitatea de schimb a materialului cercetat. Curbele de titrare ale celor mai folosiţi schimbători celulozici sînt date în figura 15.

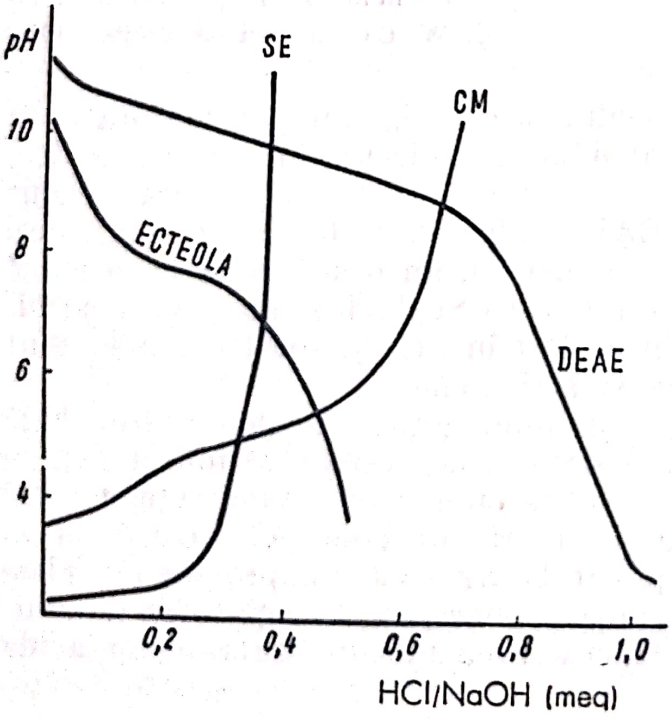


Fig. 15.—Curbele de titrare pentru schimbătorii celulozici (produse Serva-Heidelberg).

Influenţa temperaturii asupra titrării schimbătorilor este considerabilă. S-a arătat că, indiferent de pH, ionizarea grupărilor bazice a DEAE-celulozei creşte pe măsură ce temperatura se măreşte, de aceea, exprimarea valorii capacităţii de schimb trebuie făcută în raport cu temperatura determinărilor (104).

Scanned with OKEN Scanner

Alegerea schimbătorului. Cromatografia pe schimbători de ioni se efectuează în general în două scopuri: pentru fracționarea unei substanțe (scop analitic); pentru purificarea unei substanțe de alți componenți nedoriți (scop preparativ).

Dacă analiza urmărește fracționarea unei substanțe necunoscute, experimentatorul trebuie să cunoască în prealabil domeniul de pH în care substanța dată este stabilă, precum și pH-ul izoelectric aproximativ al acestei substanțe. Cunoscînd aceste date, el va alege două categorii de schimbători, anioniți și cationiți, pe care îi va folosi separat sau succesiv la pH-uri adecvate, urmărind fracționarea substanței. Dacă la un pH determinat proteina are mai multe grupări polare negative decît pozitive, este normal să se folosească un schimbător anionic, încărcat pozitiv. Invers, dacă proteina supusă analizei are un pH izoelectric mai mare decît pH-ul la care se face determinarea, ea este încărcată pozitiv și se poate folosi cu succes un schimbător cationic, încărcat negativ.

Purificarea unui component dintr-un amestec de substanțe se poate realiza pe două căi: *a*) alegerea unui schimbător care la pH-ul de lucru are aceeași sarcină cu componentul dat, dar de semn contrar cu impuritățile; în aceste condiții, componentul supus purificării va fi eluat din coloană, în timp ce impuritățile vor rămîne absorbite în coloană; *b*) alegerea unui schimbător care la pH-ul de lucru are sarcină contrară cu componentul dat, dar are aceeași sarcină cu impuritățile; în acest caz vor fi eluate impuritățile, componentul studiat fiind absorbit în coloană. Ulterior, cu un electrolit corespunzător, se eluează din coloană și componentul purificat.

Dintre cele trei tipuri de schimbători prezentate anterior, cel mai folosit pentru fracționarea și purificarea antigenelor proteice și polizaharidice este schimbătorul pe bază de celuloză. Întrebuințarea cea mai frecventă a schimbătorilor celulozici este justificată de puterea lor de rezoluție superioară rășinilor schimbătoare de ioni. Eficiența schimbătorilor pe bază de dextran este asemănătoare schimbătorilor celulozici.

După alegerea schimbătorului adecvat, experimentatorul trebuie să se hotărască asupra mărimii particulelor de schimbător pe care îl va folosi. În comerț, majoritatea schimbătorilor se găsesc în sortimente cu diferite mărimi ale particulelor. Dimensiunile acestora se exprimă de obicei prin mesh. Această unitate exprimă gradul de dispersare a particulelor, deci este o mărime invers proporțională cu dimensiunile particulelor. Corespondența dintre mesh și ochiurile unor site metalice este dată mai jos:

Grad de dispersare (mesh)	40	100	200	270	325	400
Dimensiunile ochiurilor sitei (mm)	0,42	0,149	0,074	0,053	0,044	0,037

Dimensiunile particulelor de schimbători au o mare importanță pentru viteza de scurgere a eluantului. Schimbătorii grosieri, cu dimensiuni de 40—200 mesh, vor fi folosiți pentru experiențe în care sînt necesare viteze de scurgere mari. Dimensiunile de 200—400 mesh caracterizează

Scanned with OKEN Scanner

schimbătorii fini, care dau viteze de scurgere mai mici. Mărimea particulelor nu influenţează sensibil capacitatea de fixare a proteinelor şi polizaharidelor, de aceea se pot folosi cu succes schimbători cu particule grosiere. Această tendinţă este totuşi limitată de faptul că particule mari au în coloană volumul spaţiului gol[1] mic, ceea ce determină uneori o rezoluţie mai slabă.

Alegerea tamponului pentru eluţie. Alegerea tamponului este dificilă, deoarece, în cele mai multe cazuri, macromoleculele investigate au caracteristici fizico-chimice necunoscute experimentatorului în momentul cînd execută cromatografierea lor. De aceea, sînt necesare experienţe prealabile în care se stabilesc condiţiile de fixare şi de eluare a proteinei studiate. În acest scop, se introduce într-o eprubetă de centrifugă o cantitate oarecare de schimbător echilibrat cu tamponul experimentat, la un pH şi o putere ionică determinate; se adaugă apoi proteina dizolvată în acelaşi tampon. După cîteva minute de agitare, se centrifughează şi se dozează proteina rămasă în suspernatant. Cu cît cantitatea de proteină dozată este mai mică, cu atît caracteristicile tamponului sînt mai adecvate cromatografierii. Variind pH-ul şi puterea ionică a tamponului, se pot stabili condiţiile de fixare şi de eluţie ale proteinei.

Tamponul ales trebuie să aibă un pH şi o putere ionică care să fie compatibile cu stabilitatea proteinei cercetate şi cu zona de eficienţă a schimbătorului. De exemplu, DEAE-celuloză poate fi folosită eficient numai în zona de pH 4,3 — 8,0. De asemenea, în compoziţia chimică a tamponului nu trebuie să intre electroliţi care stînjenesc metodele curente de dozare a compuşilor fracţionaţi.

Cele mai folosite tampoane în cromatografie sînt: tamponul fosfat pentru pH-uri în jurul neutralităţii (6—8), tamponul TRIS pentru pH-uri în jurul lui 8 şi tamponul acetat pentru pH-urile acide în jur de 5,0. Se folosesc de asemenea şi amestecuri de diferite substanţe, cum ar fi: tampon TRIS-fosfat, tampon fosfat-clorură de sodiu etc.

Afinitatea schimbătorilor de ioni pentru proteine depinde de puterea ionică şi de pH-ul tamponului. Eluţia se efectuează menţinînd unul dintre aceşti doi parametri constant şi variind pe celălalt, sau variind simultan ambii parametri.

Astfel, pentru un pH dat se începe eluţia cu cea mai joasă putere ionică a tamponului, pentru a permite unirea proteinei cu schimbătorul. Apoi se creşte treptat puterea ionică, ceea ce determină o diminuare a afinităţii dintre schimbător şi amestecul proteic. Desfacerea componenţilor se datoreşte competiţiei dintre ionii adăugaţi şi proteine pentru grupările polare ale schimbătorului, competiţie în urma căreia legătura proteină-schimbător este ruptă şi înlocuită cu legătura ioni-schimbător.

Menţinînd puterea ionică constantă şi variind pH-ul tamponului, se realizează de asemenea eluţia treptată a componentelor, de astă dată, datorită micşorării numărului de sarcini a proteinelor supuse analizei.

---

[1] Volumul tamponului din afara particulelor.

Astfel, o proteină adsorbită pe un cationit poate fi eluată prin creşterea pH-ului (scăderea sarcinilor pozitive), în timp ce pentru un anionit eluţia se realizează prin scăderea pH-ului (scăderea sarcinilor negative).

O coloană cu DEAE-celuloză echilibrată la pH 7 (deci încărcată pozitiv) va fixa o proteină al cărui pH izoelectric este 6,5, deci este încărcată negativ. Trecînd însă peste coloană acelaşi tampon, însă cu pH-ul coborît la 6,0, proteina se va încărca pozitiv (fiind sub punctul izoelectric) şi va fi eluată.

În sfîrşit, eluţia componentelor de pe o coloană cromatografică poate fi realizată variind concomitent atît pH-ul, cît şi puterea ionică în acelaşi sens sau în sensuri opuse.

Pregătirea schimbătorilor . Metodele de pregătire a schimbătorilor de ioni, înainte de introducerea lor în coloană, depind de natura schimbătorului folosit.

Răşinile polistirenice şi polimetaacrilice se pregătesc astfel :

Amberlit IRC-50 (75) : se iau 100 g de răşină (200—400 mesh) şi se agită 15 min cu 300 ml apă distilată. Se lasă în repaus 20 min, după care se îndepărtează lichidul supernatant. Se repetă operaţia de 5 ori, după care răşina se usucă la aer. Răşina uscată se suspendă în 500 ml de acetonă timp de 3 ore, se îndepărtează supernatantul şi se mai spală cu încă 1 000 ml de acetonă, după care se usucă la 50—60°C. Pentru a îndepărta urmele de acetonă, se spală răşina într-o pîlnie Büchner cu 3-5 l apă, după care se suspendă în 500 ml NaOH 4 N. Suspensia se fierbe timp de 10 ore, apoi, se filtrează printr-o pîlnie Büchner. Răşina se spală în pîlnie cu apă pînă la reacţia neutră a filtratului (3—5 l). Sarea de sodiu a răşinii este convertită în forma acidă (H^+) prin spălarea ei, tot în pîlnie Büchner, cu 500 ml HCl 4 N. Excesul de HCl se elimină prin spălare cu 3—5 l apă. Se reia răşina în tamponul ales pentru cromatografiere şi se spală pînă cînd pH-ul suspensiei devine egal cu cel al tamponului folosit, apoi se introduce în coloană.

Dowex-50 (NH_4^+) (130); răşina (200—400 mesh) se prelucrează cu o soluţie NaOH 4% (g/v), cu H_2SO_4 4% (v/v) şi cu o soluţie de NH_4OH tot 4% (g/v). Fiecare operaţie durează 12-16 ore, după care se spală abundent răşina cu apă pentru a îndepărta excesul reactivilor. În final, răşina se reia în tamponul folosit la cromatografiere.

Dowex-2 (Cl^-) (15) : răşina (200—400 mesh) se găseşte în comerţ sub formă de clorură. Poate fi folosită fără nici o operaţie suplimentară.

Răşinile schimbătoare de ioni pot fi folosite de mai multe ori fără scoaterea lor din coloană, cu condiţia ca după fiecare determinare să fie regenerate prin spălare cu HCl 4 N, respectiv NaOH 1 N. Dacă se trec, pe coloană extracte de ţesuturi, nu se va folosi mai mult de 4 ori coloana deoarece se îmbîcseşte.

Schimbătorii de ioni celulozici trebuie prelucraţi şi ei înainte de introducerea în coloană. DEAE-celuloza se spală cu NaOH 1 N, iar CM-celuloza cu NaOH 0,5 N şi NaCl 0,5 N, într-un pahar Berzelius prevăzut cu un agitator, pînă cînd supernatantul nu mai este colorat. Se adaugă apoi HCl 1 N pînă la acidifierea puternică a suspensiei, se filtrează imediat şi materialul reluat se suspendă în NaOH 1 N . Se centrifughează mate-

Scanned with OKEN Scanner

rialul (în soluția alcalină schimbătorii anionici filtrează greu) și se spală pînă la reacție neutră cu apă distilată. În sfîrșit, se îndepărtează apa distilată și se suspendă schimbătorul în tamponul de eluție. Se ajustează pH-ul suspensiei pînă la pH-ul tamponului de eluție, adăugînd componentul acid al tamponului. Folosind tamponul fosfat, ajustarea pH-ului se realizează cu NaH_2PO_4. Schimbătorul ajustat se spală de două-trei ori cu tamponul de eluție, avînd grijă să se îndepărteze particulele fine care nu sedimentează în 45-60 min. Nerespectarea ultimei indicații conduce la coloane cu viteze de curgere mici.

Coloana umplută cu schimbătorii celulozici nu poate fi folosită în general decît o singură dată, pentru regenerare fiind necesară scoaterea schimbătorului din coloană. Ea se efectuează cu ajutorul unei soluții 0,25-0,5 N de NaOH, pentru îndepărtarea proteinelor rămase adsorbite după terminarea eluției. După o spălare prelungită cu apă distilată pînă la neutralitate se continuă cu etanol și se usucă la temperatura camerei. Dacă urmează să fie folosit în scurt timp la altă experiență, schimbătorul se poate păstra în tamponul de eluție, la rece, adăugînd cîteva picături de toluen (5 picături/l).

Schimbătorii Sephadex se pregătesc astfel: materialul se lasă să se îmbibe într-un exces de apă timp de 1 oră, îndepărtînd apoi prin decantări repetate particulele fine.

DEAE-Sephadex-ul este spălat apoi pe un filtru Büchner cu o soluție de HCl 0,5 N, urmată de o spălare cu apă distilată. Se face o nouă spălare cu NaOH 0,5 N, încheiată de o spălare cu apă distilată pînă la reacția neutră.

CM-Sephadex-ul și SE-Sephadex-ul se spală în mod asemănător, cu deosebirea că spălările se fac în ordinea NaOH, apă, HCl, apă. Tratamentul cu HCl trebuie să fie cît mai scurt, deoarece poate altera capacitatea de schimb a schimbătorului.

După ultima spălare cu apă, schimbătorul Sephadex se echilibrează cu tamponul utilizat în experiență. De obicei se începe spălarea cu o concentrație mai mare de tampon și numai spre sfîrșitul spălării se ajunge la concentrația folosită pentru eluție. La schimbătorii Sephadex trebuie avut în vedere tendința lor de a se îmbiba excesiv de puternic dacă puterea ionică a tamponului este mică, de aceea este recomandabil ca eluția să nu înceapă la puteri ionice mai mici de 0,05. În caz contrar, în masa gelului apar cavități care nu permit o viteză de scurgere constantă a eluantului. Regenerarea schimbătorilor Sephadex se face după scoaterea lor din coloană, prin spălare cu NaOH 0,5 N, apă distilată și HCl 0,5 N în ordinea indicată mai sus.

Coloana și încărcarea ei. Coloanele cromatografice se compun dintr-un tub de sticlă de diametrul dorit, prevăzut la un capăt cu un robinet. Deci, o coloană cromatografică se aseamănă cu o biuretă, cu deosebirea că are la capătul inferior un fund plan de sticlă poroasă (frită), pe care se sprijină stratul de schimbători de ioni, asigurînd o umplere corectă. Frita poate fi înlocuită cu un strat de vată de sticlă (fig. 12). Pentru a putea

lucra la temperatură constantă, coloanele sînt prevăzute cu o manta prin care circulă apa de la un ultratermostat.

Dimensiunile coloanelor cromatografice depind de tipul schimbătorului folosit. Rășinile polistirenice și polimetaacrilice necesită coloane cu un raport mare lungime/diametru, cuprins între 15/1 și 150/1 (80). Schimbătorii celulozici se introduc în coloane cu raportul dimensiunilor mai mic, cuprins între 5/1 și 20/1. În sfîrșit, coloanele umplute cu schimbători Sephadex au în mod obișnuit cel mai mic raport lungime/diametru, cuprins între 5/1 și 10/1.

Diametrul coloanelor cromatografice poate varia în limite largi însă creșterea sau scăderea lui atrage întotdeauna lungirea sau scurtarea coloanei cromatografice, pentru păstrarea raporturilor indicate mai sus. Gradul de dispersie a schimbătorilor de ioni folosiți este dependent de diametrul coloanei cromatografice. La diametre mari (peste 2 cm) se folosesc schimbători grosieri (40—100 mesh), iar la diametre mici schimbători cu particule fine (100—400 mesh). Astfel, DEAE-celuloză de 40—100 mesh nu se va introduce în coloane cu un diametru interior mai mic de 1,5 cm.

Umplerea coloanelor cromotografice necesită o deosebită atenție, pentru a se putea asigura o densitate uniformă. Orice neregularitate, spații lacunare, particule așezate neuniform sau de mărimi diferite, determină zone de schimb ionic neuniforme, care pot compromite întreaga lucrare.

Introducerea schimbătorului de ioni în coloană se face în mai multe feluri, după natura materialului. Turnarea suspensiei de schimbători de ioni în coloană nu trebuie să se facă cu pipeta, în porțiuni, pentru a nu se crea zone cu granulație diferită. Umplerea coloanei se face într-o singură etapă, prin atașarea la coloană a unui tub de sticlă cu același diametru, dar de 10 ori mai lung; tubul are în capătul superior fixată o pîlnie. Închizînd robinetul coloanei cromatografice, se umple întreaga instalație pînă la pîlnie cu tamponul de echilibru, după care se adaugă în pîlnie, repede, suspensia de schimbători bine amestecată, deschizînd robinetul de curgere după depunerea unui strat de 1—2 cm. Pentru schimbătorii pe bază de celuloză și dextran, suspensia adăugată trebuie să conțină 1 g de schimbători la 50—100 ml.

Sedimentarea schimbătorului se face prin forța gravitațională sau prin aplicarea unei suprapresiuni care crește constant pe măsură ce coloana se umple. Suprapresiunea se folosește în general pentru umplerea coloanelor cu schimbători celulozici. Pentru realizarea unei suprapresiuni de 0,3—0,5 atm, se poate folosi fie o coloană de apă 1—3 m, fie o butelie cu gaz inert, folosind un dispozitiv de siguranță manometric.

Coloanele cu schimbători celulozici umplute fără suprapresiune sînt, în general, mai puțin stabile din punct de vedere fizic și au o putere de rezoluție micșorată, din cauză că volumul lichidului interstițial (volumul spațiului gol) este mai mare.

După umplerea coloanei pînă la nivelul dorit, se îndepărtează tubul prelungitor cu pîlnia și se lasă ca schimbătorul să-și reia spontan, prin

Scanned with OKEN Scanner

elasticitatea lui proprie, un volum constant. Se plasează apoi pe suprafaţa orizontală a schimbătorului un disc din hîrtie de filtru sau din burete de poliuree (răşinile schimbătoare nu trebuie acoperite). În tot timpul analizei, orizontalitatea suprafeţei superioare a schimbătorului trebuie să fie menţinută riguros. La coloană se conectează apoi rezervorul cu tampon, avînd grijă să se asigure o coloană continuă de lichid. Se spală peste noapte cu tamponul de echilibrare, la temperatura la care se va efectua cromatografia. Nu trebuie uitat că încărcarea coloanei se efectuează la temperatura camerei, chiar dacă ulterior separarea se va face la temperaturi scăzute. Această precauţie este necesară pentru a preîntîmpina formarea bulelor de aer în coloană.

Introducerea probei. Proteina sau polizaharidul ce va fi cromatografiat, trebuie să fie echilibrat faţă de tamponul cu care se începe eluţia. Echilibrarea se realizează dializînd sau filtrînd prin gel soluţia analizată faţă de tamponul de eluţie. Echilibrarea riguroasă a probei cu tamponul de eluţie este necesară mai ales în cazul componenţilor care se adsorb slab pe schimbători, deoarece comportarea lor cromatografică este influenţată considerabil de mici variaţii în concentraţia salină sau în pH-ul de eluţie.

După dializă sau filtrare prin gel, probele trebuie centrifugate pentru îndepărtarea tuturor particulelor insolubile care pot să existe în soluţie; materialele insolubile, chiar foarte fin dispersate, produc întotdeauna îmbîcsirea coloanei manifestată prin încetinirea şi chiar oprirea debitului de curgere a tamponului.

Volumul probei de analizat trebuie să fie cît mai mic posibil, mai ales dacă amestecul analizat are componenţi ce migrează în coloană sub influenţa tamponului cu care se începe eluţia (volumul maxim care se poate introduce nu trebuie să depăşească 20% din volumul întregii coloane).

Cantitatea de proteină din probă nu trebuie să aibă o concentraţie care să depăşească capacitatea de fixare a coloanei folosite. Răşinile schimbătoare se încarcă în general cu mai puţină proteină decît schimbătorii celulozici. Astfel, într-o coloană de 25/1 cm umplută cu Amberlit IRC-50 se poate introduce 20—30 mg proteină dizolvată în 1—2 ml tampon. O coloană cu aceleaşi dimensiuni, încărcată însă cu DEAE- sau CM-celuloză (3—4 g schimbător uscat) poate primi pînă la 200 mg proteină. Schimbătorii Sephadex au o capacitate de fixare şi mai mare, coloane cu dimensiuni mici (6,5/1 cm) fiind capabile să adsoarbă 1 g proteină. În general, schimbătorii celulozici şi Sephadex-ul pot da separări bune dacă se adaugă 0,1 g proteină la 1 g schimbător uscat.

Pentru a introduce proba în coloană se procedează astfel: se deschide robinetul şi se lasă ca nivelul tamponului de echilibrare să atingă suprafaţa schimbătorului; în acest moment se închide robinetul. Se pipetează apoi proba cu grijă pe pereţii coloanei. Stratul de lichid format este lăsat să pătrundă apoi uniform în coloană, deschizînd imediat robinetul. Cînd tot volumul adăugat a intrat în coloană, se spală de cîteva ori suprafaţa schimbătorului cu porţiuni mici din tamponul de echilibrare. Fiecare porţiune de spălare este lăsată să pătrundă în coloană înainte de a adăuga

porţiunea următoare. Volumul total al porţiunilor de spălare nu trebuie să depăşească volumul probelor introduse. Se închide din nou robinetul. Se adaugă cu grijă tamponul de echilibrare pînă la umplerea coloanei şi se conectează rezervorul de alimentaţie în aşa fel încît nici o bulă de aer să nu existe în sistem. Se deschide robinetul şi se începe eluţia. În timpul acestor operaţii se va evita uscarea stratului superior al schimbătorului.

Eluţia în etape (*discontinuă*) (16). Eluţia în etape se realizează prin trecerea succesivă peste coloană a unor soluţii tampon cu pH şi putere ionică diferite. În acest fel se desfac pe rînd legăturile dintre schimbători şi fiecare tip de proteină prezentă în amestecul analizat, realizîndu-se eluţia lor treptată. Alegerea succesiunii tampoanelor se face ţinînd seama de proprietăţile fizico-chimice ale proteinelor analizate şi de caracterul schimbătorilor folosiţi. Cele mai folosite combinaţii sînt următoarele :

a) Se adaugă tampoane cu putere ionică din ce în ce mai mare, în timp ce pH-ul lor este din ce în ce mai mic (în special pentru schimbătorii anionici). Astfel, pentru purificarea tripsin-inhibitorului din colostru, pe DEAE-celuloză, se folosesc 4 tampoane de fosfat sodic (M/pH) : 0,005/7,0 ; 0,005/6,5 ; 0,05/5,5 ; 0,5/4,3 (88).

b) Se adaugă tampoane cu putere ionică şi pH din ce în ce mai mare (în special pentru schimbători cationici). Astfel, pentru purificarea tripsin-inhibitorului din colostru pe CM-celuloză, se utilizează trei tampoane de fosfat (M/pH) : 0,005/5 ; 0,04/6,0 ; 0,2/8,0 cu adaos de NaCl 1 M(88).

c) Se adaugă tampoane cu pH-ul constant, dar cu forţă ionică în creştere şi invers, cu pH-ul variind şi cu puterea ionică menţinută constantă. Astfel, pentru fracţionarea şi purificarea proteinelor din albuşul de ou pe CM-celuloză, s-a utilizat o serie de tampoane acid acetic-hidroxid de amoniu 0,1 M cu pH-ul în creştere de la 4,4 la 9,5 (122).

Eluţia în etape este metoda cea mai des utilizată, fiind uşor de realizat experimental şi permiţînd o fracţionare avansată a proteinelor. Ea permite introducerea la anumite etape de eluţie a unor ioni noi, ceea ce în unele fracţionări poate avea un efect favorabil.

Comparată cu procedeul de eluţie în gradient, metoda eluţiei discontinue are următoarele dezavantaje :

— putere de rezoluţie mai mică ;

— poate determina eluarea simultană, într-un singur pisc (maxim), a mai multor fracţiuni din substanţa supusă analizei. Acest accident survine mai ales dacă există diferenţe mari de pH şi putere ionică între două tampoane succesive sau dacă coloana s-a încărcat cu o cantitate de proteină ce depăşeşte capacitatea ei de fixare şi de schimb. Încărcarea excesivă a coloanei este o cauză de eroare şi la eluţia în gradient ;

— pot apărea două maxime pentru un singur component omogen. Acest accident intervine dacă se schimbă tamponul chiar în momentul în care o fracţiune dată trece prin coloană. Tamponul nou produce eluţia restului de proteină sub forma unui pisc îngust, lipit de primul, lăsînd impresia că s-au separat două proteine (fig. 16).

Din figură se observă că al doilea pisc al conalbuminei apare imediat după schimbarea pH-ului (6,0 la 6,7), înainte ca întreaga cantitate

Scanned with OKEN Scanner

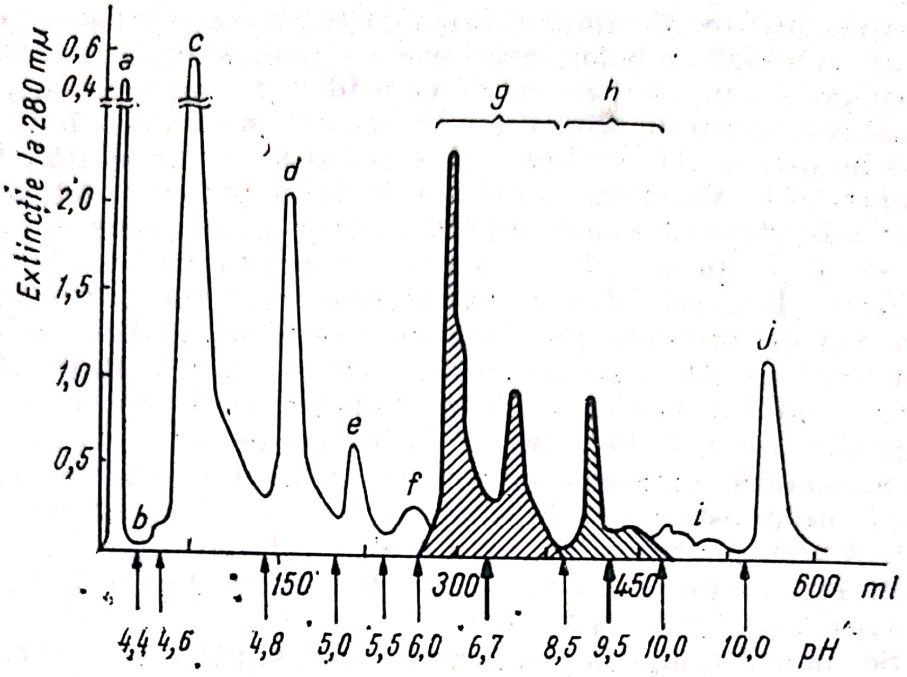


Fig. 16. — Separarea proteinelor din albuşul de ou pe CM-celuloză; fracţiunile haşurate reprezintă artefacte (sub două piscuri este cuprinsă aceeaşi proteină).

a, Ovomucoid+flavoproteină; *b*, ovomucoid; *c*, ovalbumina A_1; *d*, ovalbumina A_2; *e*, ovalbumina A_3; *f*, globulină neidentificată; *g*, conalbumină; *h*, globulină neidentificată; *i*, avidina; *j*, lizozim (după *H. A. Sober* şi colab., 1960).

de conalbumină să fie eluată. Pentru globulina neidentificată, schimbarea de pH s-a operat de asemenea în momentul în care fracţiunea trecea prin coloană (131).

Pentru înlăturarea acestui neajuns trebuie urmărit cu atenţie sfîrşitul eluţiei unei fracţiuni (reacţie negativă pentru proteine) şi numai atunci se efectuează schimbarea tamponului.

Eluţia în gradient (continuă) (3) (13) (38). Accidentele care intervin în eluţia discontinuă, datorită variaţiilor bruşte de pH sau putere ionică ale soluţiilor de tampon aplicate, pot fi complet evitate prin folosirea eluţiei în gradient. În acest caz puterea de eluţie a tamponului este crescută treptat şi piscurile proteice obţinute pot fi interpretate mai sigur decît cele obţinute la eluţia în etape.

Puterea de rezoluţie a separărilor în eluţia continuă este mai mare decît în cea discontinuă. De aceea, prima metodă este folosită cu precădere mai ales în scopuri analitice, cînd se urmăreşte fracţionarea amestecului proteic în cît mai multe piscuri cromatografice distincte. Această comportare este determinată de faptul că adsorbţia proteinelor în coloană se modifică considerabil chiar prin schimbări mici în compoziţia tamponului, realizată prin eluţia în gradient (38).

Gradientul de eluţie se poate realiza crescînd puterea ionică, dar păstrînd pH-ul constant, sau crescînd puterea ionică şi scăzînd concomitent

pH-ul. Oricare ar fi sensul variației pH-ului și al puterii ionice trebuie realizată o urcare lină a gradientului în regiunea unde se eluează proteine care au o afinitate asemănătoare față de schimbătorul de ioni și o creștere mai rapidă în zona în care afinitatea proteinelor pentru schimbător este mult diferită.

Realizarea gradientelor se poate efectua prin diferite metode. Un sistem mult întrebuințat este acela al con-sferei (109). Instalația se compune din două pahare conice (Erlenmayer) de același volum (V_2 și V_3), unite la baza lor printr-un tub de sticlă. Aceste două pahare sînt puse în legătură cu un balon al cărui volum (V_1) trebuie să fie mai mare sau cel puțin egal cu volumul ambelor pahare conice. Uneori între acestea și balon se adaptează un tub prevăzut cu un robinet cu trei căi care ajută la egalarea nivelelor din vasul balon și primul pahar conic. Al doilea pahar conic are un dop cu un capilar care reglează nivelul lichidului din acest pahar. În funcție de înălțimea nivelului din ultimul pahar conic se poate modifica forma gradientului de eluție. Un nivel mai ridicat al lichidului determină o accentuare a convexității gradientului (fig. 17, *a*).

Folosindu-se un volum de 130 ml de tampon fosfat-TRIS în balon și un volum total de 80 ml în cele două pahare conice, s-a putut separa serul sanguin de cobai pe o coloană de DEAE-celuloză, obținîndu-se fracțiunile și gradientul din figura 17, *b* (118). Tamponul inițial a avut în balon un amestec de acid fosforic 0,005 M și TRIS 0,004 M, pH 8,6 iar în vasele conice TRIS-H_2PO_4 0,35 M, pH 4,5 (42,35 g TRIS la care se adaugă 34,3 g H_3PO_4 și se aduce volumul la 1000 ml).

O instalație simplă, care poate fi realizată cu ușurință în orice laborator, este înfățișată în figura 18 (91).

Vasul rezervor este o pîlnie de separare transformată într-un vas Mariotte, legat în partea sa inferioară de un Erlenmayer folosit ca vas de amestecare și prevăzut cu agitator magnetic. Vasul are la partea sa inferioară un tub cu robinet prin care se scurge eluantul în coloană. Ca și în celelalte cazuri, în vasul rezervor se introduce soluția mai concentrată, iar în vasul de amestecare soluția cu care se începe eluția. Vasul de amestecare se umple complet. Lichidul care curge din vasul inferior în coloană este imediat înlocuită de lichidul ce se scurge din pîlnie și care determină creșterea treptată a concentrației eluantului, după ecuația :

$$c = c_2 - De^{-k},$$

unde c = concentrația tamponului care curge în coloană ; c_2 = concentrația în vasul rezervor ; D = diferența dintre concentrația inițială a tamponului în vasul rezervor și cel de amestecare ; k = raportul dintre volumul de eluție curs și volumul fix al vasului de amestecare.

Cu această instalație se realizează un gradient convex, care poate fi variat în timpul experienței prin schimbarea concentrației tamponului în vasul superior (rezervor). Prin schimbarea concentrației în vasul rezervor se obține modificarea convexității gradientului, fapt care ușurează uneori separarea proteinelor cu afinitate similară pentru schimbători.

Scanned with OKEN Scanner

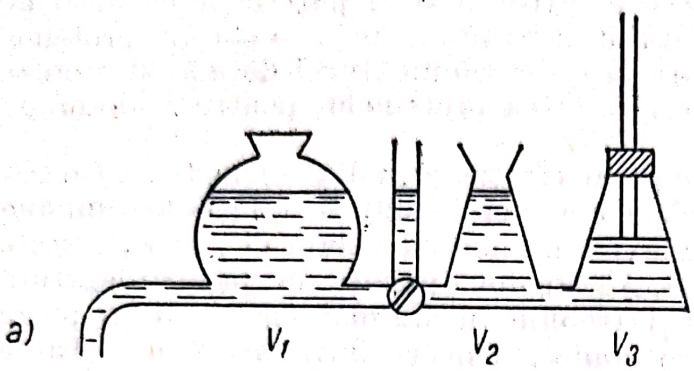
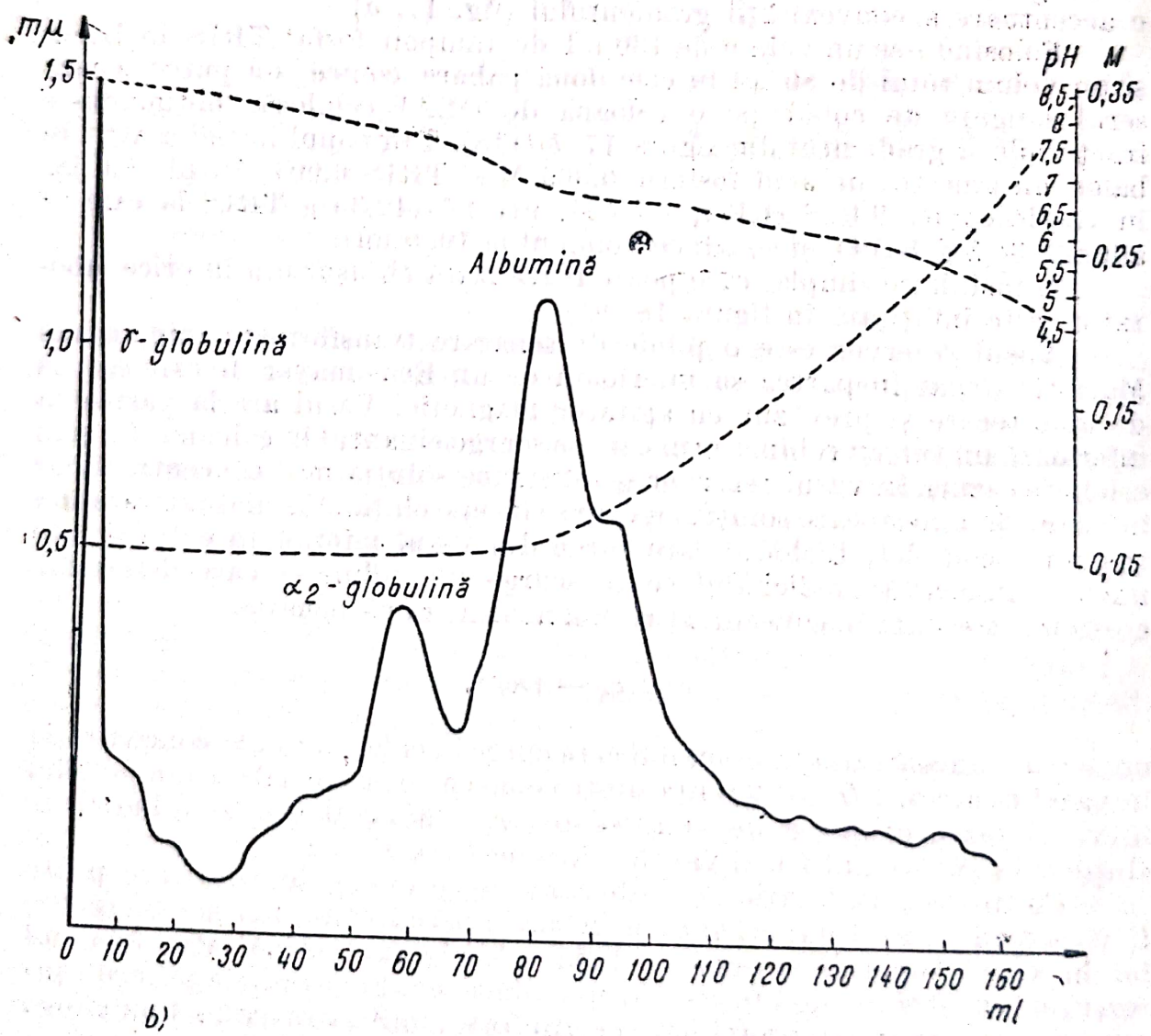


Fig. 17. — a, Schema instalației con — sferă de realizare a gradienților (după A. E. Peterson și colab., 1961) ; b, schema cromatografiei serului de cobai pe DEAE-celuloză, folosind un gradient realizat prin sistemul con — sferă (adaptată după N. Racoveanu și colab., 1965).



Scanned with OKEN Scanner

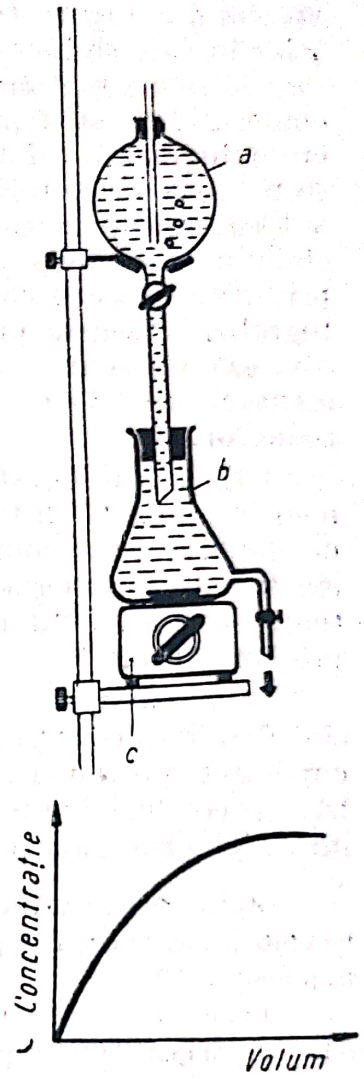


Fig. 18. — Instalație simplă pentru eluție în gradient. a, Vas rezervor; b, vas de amestec; c, agitator magnetic.

Funcționarea instalațiilor pentru eluția în gradient se verifică înaintea determinărilor propriu-zise, introducînd în vasul rezervor o soluție apoasă saturată de acid picric, iar în vasul de amestecare apă. Absorbția acidului picric la 355 mμ este proporțională cu concentrația, chiar diluînd soluția saturată de 500 de ori. Prin măsurarea extincției în fracțiunile colectate se stabilește forma liniară, convexă sau concavă a gradientului existent în instalația folosită.

Verificarea gradientului trebuie făcută și în experiențele propriu-zise, efectuînd în fracțiunile colectate măsurători de pH și de conductibilitate (pentru măsurarea concentrațiilor). Se asigură astfel reproductibilitatea determinărilor. Dacă curbele de variație ale pH-ului sau ale puterii ionice în timpul eluției sînt identice sau aproape identice de la o determinare la alta, se asigură atît reproductibilitatea experiențelor efectuate pe un amestec dat, cît și posibilitatea de a compara curbele de eluție a două amestecuri diferite.

Debitul și temperatura eluției (108). Pentru majoritatea schimbătorilor de ioni, debitul de curgere al eluantului nu are o influență sensibilă asupra puterii de rezoluție a coloanei. Din acest motiv se pot folosi debite foarte variate, cuprinse între 4 ml/oră și 180 ml/oră. În general, se preferă debite în jur de 30 ml/oră. Debitul de curgere a tamponului depinde de mai mulți factori: *a*) diametrul coloanei; *b*) lungimea porțiunii din coloană umplută cu schimbători; *c*) mărimea particulelor schimbătorului; *d*) compoziția tamponului și *e*) presiunea aplicată.

Diametrul și lungimea coloanei determină de obicei și mărimea particulelor schimbătorului folosit. La diametre mari se preferă schimbători cu particule grosiere, pentru a permite o viteză de curgere compatibilă cu scopurile preparative urmărite. Coloane cu diametre mici, folosite în scopuri analitice, se încarcă de obicei cu schimbători avînd particule medii sau fine.

La începutul eluției se realizează întotdeauna debite mari, deoarece tamponul are o concentrație salină mică. Pe măsură ce concentrația salină crește, se mărește și rezistența internă a coloanei, iar debitul devine din ce în ce mai mic. În această situație, pentru a crește debitul, experimentatorul are tentația să mărească presiunea aplicată, ceea ce nu face decît să comprime coloana, făcînd-o și mai impenetrabilă. Micșorarea

Scanned with OKEN Scanner

vitezei de curgere trebuie deci tolerată spre sfîrşitul tuturor experienţelor în care se lucrează cu un gradient puternic de concentraţie.

Pentru realizarea curgerii lichidului din rezervor se foloseşte presiunea hidrostatică pe care o exercită coloana continuă de lichid din coloana cromatografică, tuburile de alimentaţie şi rezervorul cu tampon. Presiunea se menţine constantă dacă acesta se astupă cu un dop de cauciuc prevăzut cu un tub Mariotte cu diametrul de 2—3 mm chiar dacă nivelul lichidului din vas scade. Creşterea sau micşorarea presiunii se realizează prin ridicarea sau coborîrea vasului cu lichid în raport cu coloana cromatografică. Această presiune hidrostatică nu poate asigura în unele cazuri o viteză de scurgere satisfăcătoare, de aceea se aplică o presiune suplimentară de 0,3—0,5 atm, realizată cu o bombă de azot prevăzută cu un reductor.

La cromatografierea proteinelor este prudent ca temperatura să se menţină scăzută în tot timpul eluţiei. În acest fel se exclude posibilitatea de denaturare a compuşilor biologici activi. Cu toate acestea, se poate efectua şi cromatografierea la temperatura camerei, cu condiţia ca această temperatură să nu depăşească o limită periculoasă pentru activitatea proteinei studiate.

Colectarea şi examinarea fracţiunilor. Operaţiile care se efectuează sînt detaliate la expunerea filtrării prin gel. În plus, trebuie amintit că recuperarea proteinelor introduse în coloană este foarte bună pentru schimbătorii celulozici şi Sephadex, care au o capacitate de adsorbţie nespecifică mică. Valorile găsite în mod obişnuit trec de 80%.

Aplicaţii. Schimbătorii de ioni, în special cei pe bază de celuloză şi de dextran, sînt întrebuinţaţi pe scară largă la prepararea şi purificarea antigenelor (tabelul nr. 8) şi anticorpilor (capitolul VII/I/3).

Cromatografia pe schimbători de ioni permite de asemenea eliberarea antigenelor proteice de impurităţile neproteice. Astfel, prin cromatografie, pe DEAE-celuloză, albumina serică umană poate fi separată de agaroză (fig. 19) (100).

La pH-ul şi puterea ionică aplicată, proteina cercetată se fixează pe schimbător, iar polizaharidul neîncărcat electric este eluat în primele fracţiuni. După îndepărtarea impurităţii se schimbă pH-ul şi puterea ionică a tamponului, astfel că proteina dată se desface de schimbător şi se recuperează cantitativ.

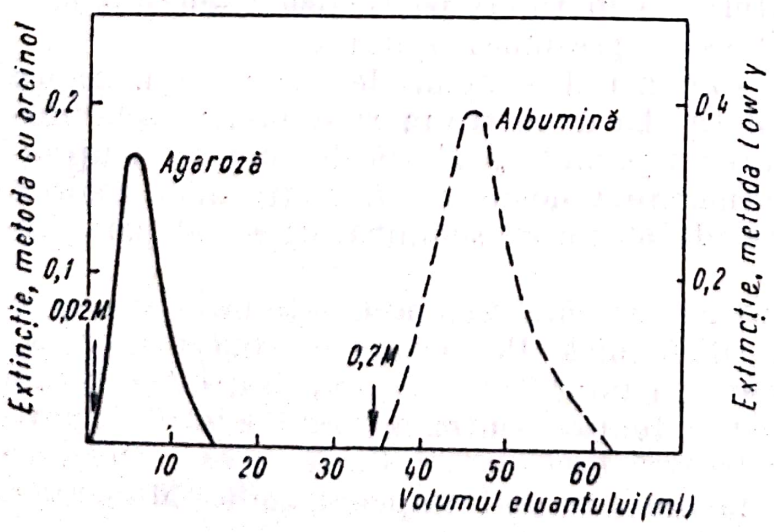


Fig. 19.— Cromatografia, pe DEAE-celuloză, a unui amestec de albumină serică umană şi agaroză, coloană 8/1, cm, tampon fosfat de sodiu pH = 8,0 (eluţia s-a făcut la 0,02 M şi 0,2 M) (după D. Mofet şi colab., 1964).

Scanned with OKEN Scanner

4. Electroforeza preparativă (14) (85) (134)

Analiza electroforetică are două aplicaţii principale: stabilirea numărului de componenţi dintr-un amestec complex şi separarea unui component dintr-un amestec.

Stabilirea numărului de componenţi dintr-un amestec se efectuează întotdeauna în scop analitic, pentru a determina gradul de complexitate a unui component izolat din ţesuturi sau umori. Aplicată în acest scop, electroforeza în zonă (în mediu poros) este mai eficientă decît cea liberă (în mediu lichid), permiţînd o fracţionare mai înaintată a proteinelor analizate (de ex. electroforeza în gel de amidon). În plus, electroforeza în zonă permite identificarea fracţiunilor proteice separate, prin efectuarea unor reacţii de recunoaştere direct în mediul pe care s-a făcut separarea lor. Se pot astfel evidenţia activitatea lor enzimatică, caracterele imunochimice, conţinutul în glucide, lipide, acizi nucleici etc.

Aplicată în scopuri preparative, electroforeza în zonă este de asemenea mai eficientă decît cea liberă. Eficienţa electroforezei preparative trebuie judecată în raport cu doi factori: cantitatea de proteină care poate fi prelucrată în unitatea de timp şi gradul de puritate în care se obţine fracţiunea studiată. Analizată sub acest aspect, electroforeza liberă cu aparat Tiselius permite prelucrarea unei cantităţi mai mari de proteine decît metodele curente de electroforeză în zonă, însă gradul de puritate al componenţilor separaţi lasă mult de dorit dacă amestecul conţine mai mult de 2 componenţi (fig. 20). De aceea, electroforeza liberă nu poate fi folosită cu rezultate bune în scopuri preparative.

Electroforeza preparativă în zonă se practică în mod curent pe hîrtie (36) (61) (40) (73) dar mai ales pe bloc de amidon şi în gel de agar şi agaroză.

Electroforeza preparativă în bloc de amidon* (85) (87)

Hîrtia de filtru are dezavantajul că adsoarbe cantităţi însemnate de proteine în timpul electroforezei. Această adsorbţie este ireversibilă şi pare independentă de concentraţia proteică, de aceea soluţiile proteice

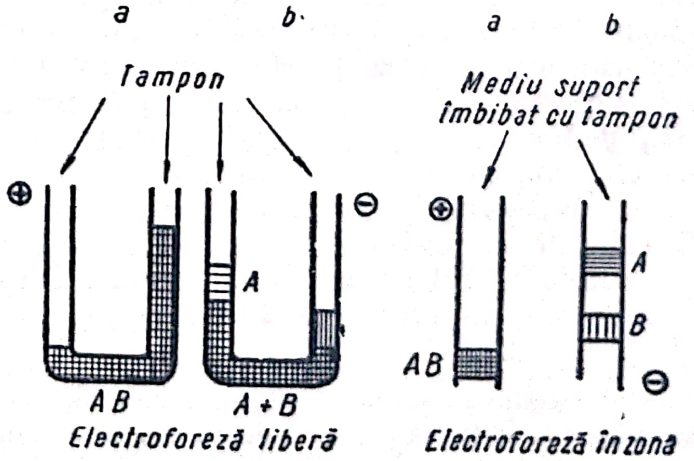


Fig. 20.— Separarea componentelor în electroforeza liberă şi electroforeza în zonă. a, Începutul analizei; b, sfîrşitul analizei.

* Electroforeza în bloc de amidon trebuie deosebită de electroforeza în gel de amidon. Ultima se aplică numai în scop analitic şi foloseşte amidon hidrolizat.

Scanned with OKEN Scanner

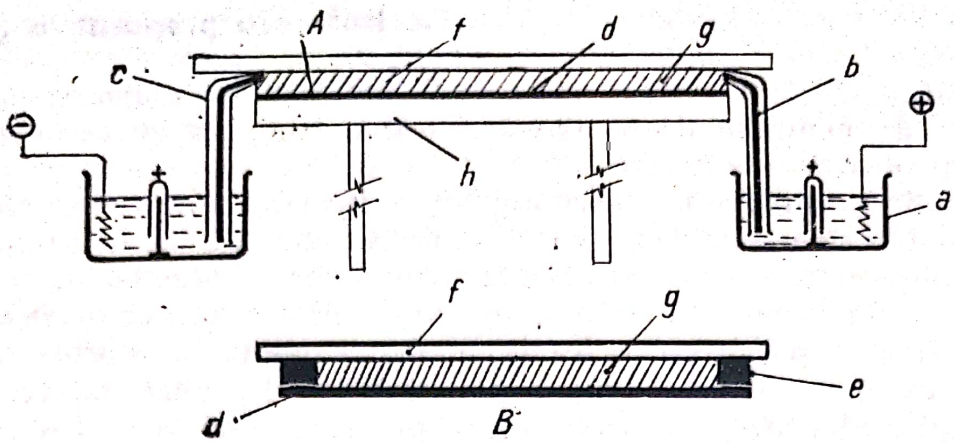


Fig. 21. — Aparat pentru electroforeza în bloc de amidon. A, Secțiune longitudinală; B, secțiune transversală.

a, Vas pentru electrozi; *b*, punte de hîrtie de filtru groasă; *c*, manșon de celofan pentru împiedicarea evaporării tamponului de pe punțile de legătură; *d*, matriță din sticlă sau plastic; *e*, bare paralelipipedice pentru realizarea matriței; *f*, placă de sticlă sau coală de material plastic pentru acoperirea blocului; *g*, blocuri de amidon; *h*, masă suport.

cu concentrație joasă pierd cantități însemnate de material în cursul analizei. În plus, folosirea hîrtiei de filtru la electroforeza continuă necesită o aparatură specială.

Electroforeza preparativă pe bloc de amidon elimină ambele dezavantaje: nu adsoarbe ireversibil decît cantități neînsemnate de proteină și necesită o aparatură simplă. De aceea și folosirea ei în scopuri preparative este foarte răspîndită. Blocul de amidon cere însă manipulări foarte precise, iar succesul separării depinde foarte mult de tehnica și de experiența cercetătorului.

Aparatul. Aparatul pentru electroforeza în bloc de amidon se compune din două vase prevăzute cu electrozi, între care se plasează o masă, cu înălțime reglabilă, pe care se așază matrița care conține blocul de amidon (fig. 21).

Matrița în care se introduce blocul de amidon are dimensiuni variabile, în funcție de cantitatea de proteină supusă fracționării. În mod obișnuit se folosesc matrițe cu lungimea de 20—30 cm și lățimea de 10—20 cm. Ele se realizează foarte simplu, folosind cîte o placă de sticlă sau material plastic, pe lungimea căreia, la margini, se așază două bare paralelipipedice de material plastic (vezi fig. 21). În timpul fracționării, vasele cu electrozi pot rămîne deschise.

Prepararea blocului de amidon (86). Se utilizează amidon din cartofi, spălat în prealabil de două-trei ori prin decantare cu apă distilată și cu tamponul folosit la electroforeză[1]. După ultima decantare, amidonul se reia într-un volum mic de tampon (1 parte amidon + 1 parte tampon),

[1] Dacă se urmărește eliminarea tuturor impurităților din amidon se poate face spălarea cu tampon la 58°C. Nu trebuie depășită temperatura de 60°C, deoarece amidonul se gelifică.

Scanned with OKEN Scanner

realizîndu-se astfel o suspensie groasă. Suspensia de amidon se introduce în matriţa aşezată pe masa-suport. Capetele deschise ale matriţei se închid cu hîrtie de filtru groasă, care scoate excesul de lichid din amestecul de amidon pînă cînd tot lichidul dispare de pe suprafaţa blocului. Dacă nu s-a atins consistenţa optimă prin menţinerea hîrtiei de filtru la capetele matriţei, se poate aplica deasupra blocului o foaie de hîrtie de filtru groasă, exercitînd cu o placă de sticlă o uşoară presiune. În acest fel se obţine un bloc de amidon comprimat, cu suprafaţă netedă. Îndepărtarea excesului de tampon trebuie efectuat corect, altfel blocul crapă sau se înmoaie excesiv. Umiditatea optimă a blocului este atinsă în momentul cînd se poate tăia în el cu uşurinţă şanţul îngust care serveşte la introducerea probei. Dacă blocul s-a uscat prea mult, el poate fi umezit cu tampon şi uscat din nou pînă la consistenţa dorită.

Analiza. Se taie cu o lamă un şanţ de maximum 1 cm lăţime, fără a atinge însă marginile laterale ale blocului de amidon. Într-un şanţ lung de 20 cm şi lat de 1 cm se pot introduce, de exemplu, 5 ml ser sanguin. Amestecul proteic se poate introduce în două feluri : se pipetează direct, iar şanţul se închide, comprimînd cu o spatulă blocul de amidon din jur, sau se amestecă proba cu o suspensie groasă de amidon şi se introduce în şanţ.

Se acoperă întreaga suprafaţă a blocului cu o coală de material plastic astfel aplicată încît să nu rămînă sub ea bule de aer. De aceea aceasta se aşază treptat, prin derulare, pornind de la locul în care s-a aplicat proba. Materialul plastic poate fi înlocuit cu succes de o placă de sticlă aşezată cu grijă pe suprafaţa blocului şi rezemată la margini de bare. Între sticlă şi suprafaţa blocului nu trebuie să existe spaţiu liber. În caz contrar, picăturile de condensare formate în acest spaţiu pot compromite analiza.

Se face apoi contactul dintre vasele cu electrozi şi capetele blocului prin punţi din hîrtie de filtru groasă sau din ţesătură de bumbac (tifon). Punţile sînt învelite în celofan, pentru a se evita evaporarea. Curentul de electroendosmoză determină uneori o acumulare de lichid la capătul catodic al blocului de amidon. Acest neajuns poate fi evitat dacă se creşte distanţa dintre suprafaţa tamponului şi blocul de amidon (se lungesc punţile de contact).

Potenţialul aplicat depinde de consistenţa blocului şi de natura tamponului folosit. El trebuie ales în aşa fel încît să se excludă posibilitatea încălzirii blocului. Obişnuit se folosesc 5—10 V/cm. Pentru blocuri cu grosime de 1,5 cm se admite o intensitate de curent de 2—3 mA/cm.

Mulţi autori recomandă efectuarea analizei la temperaturi scăzute, însă această precauţie nu este necesară. În plus, la temperatura camerei, viteza de migrare a proteinelor fiind mai mare, timpul de fracţionare se scurtează.

După încheierea analizei, se îndepărtează punţile de legătură şi peste bloc se aplică o ţesătură de bumbac pentru a suge excesul de umezeală. Această operaţie este în special necesară dacă blocul are tendinţa să se înmoaie.

Scanned with OKEN Scanner

Eluţia proteinelor. Blocul se taie în segmente înguste de 1—2 cm şi se repartizează în eprubete. Eluţia se face prin adăugarea unei soluţii saline (obişnuit NaCl 0,15 M). Se amestecă soluţia cu amidonul şi se centrifughează. O mare parte din proteina totală prezentă în segmentul de amidon trece în supernatant. Cu ajutorul acestui procedeu se stabileşte de obicei distribuţia fracţiunilor proteice în bloc. Pentru a realiza eluţia cît mai completă a proteinelor dintr-o porţiune unde este concentrată o fracţiune dată, se procedează astfel : bucata de amidon care conţine întreaga fracţiune se mărunţeşte şi se aşază într-un filtru cu sită cu diametrul mic, care funcţionează ca o mică coloană. Se adaugă soluţia de eluţie în două porţiuni mici şi se trage la vid. Un volum de lichid egal cu volumul cuprins în bloc este suficient pentru deplasarea proteinelor din amidon. Folosind acest sistem de eluţie, se pot recupera peste 90% din proteinele separate. γ-globulinele se recuperează mai slab (80%). Determinarea conţinutului în glucide a proteinelor izolate este dificilă, din cauza impurificării produse de amidon. Blocul de amidon nu poate folosi la separarea peptidelor cu greutate moleculară mică, deoarece acestea intră în granulele amidonului şi nu migrează liber.

Electroforeza preparativă în gel de agar sau agaroză (141) (121)

Electroforeza preparativă se execută cu un aparat uzual de electroforeză, la temperatura camerei. Suprafaţa pe care se întinde agarul are mărimea dorită de experimentator, iar înălţimea stratului nu trebuie să depăşească 1,5 cm.

Prepararea gelului. Plăcile de sticlă se introduc în cutii cu un perete rabatabil. Gelul se răceşte la 60°C şi se toarnă în cutii peste plăci, astfel încît să formeze deasupra acestora un strat cu grosimea dorită. După întărire se secţionează gelul, urmărind marginile plăcii. Se desface peretele rabatabil şi se scot plăcile. Concentraţia agarului în gel este cuprinsă în jur de 1,5g%. În şanţul de aplicare se introduce antigenul amestecat cu un volum egal de gel. Gelul se leagă cu tamponul din cuvă prin intermediul unor benzi de hîrtie de filtru sau sugativă. Peste gel se aplică o foaie subţire de polietilenă, avînd grijă să se elimine bulele de aer. Deasupra se poate aşeza o placă de sticlă. Principalul dezavantaj al gelului de agar îl constituie recuperarea incompletă a proteinelor prin metodele curente de eluţie (46).

Eluţia proteinelor. Se mărunţeşte blocul şi se introduce într-o eprubetă de centrifugă. Se îngheaţă brusc conţinutul eprubetei cu un amestec de zăpadă carbonică şi acetonă. Se centrifughează apoi la 10 000 g timp de 30 min la temperatura camerei. Prin decongelare şi centrifugare se separă două faze, una solidă, conţinînd agarul, şi alta lichidă, constituită din tamponul folosit la electroforeză şi proteina eluată. Sedimentul de agar se acoperă din nou cu tampon (jumătate din volumul iniţial), se amestecă bine, se congelează şi se centrifughează. Supernatantul conţine restul proteinei eluate. Prin acest procedeu s-au eluat, cu randamente

Scanned with OKEN Scanner

bune, γ-globulina de iepure şi antigenele organospecifice ale ficatului (141). Aplicînd acest procedeu, în eluat trece şi fracţiunea solubilă din agar; ea nu împiedică efectuarea reacţiilor imunochimice, dar nu permite dozarea polizaharidelor.

Agaroza. Înlocuirea agarului cu agaroza elimină operaţiile de îngheţare-dezgheţare, micşorînd astfel pericolul denaturării proteinelor. Agaroza are o putere de rezoluţie electroforetică mai mare decît agarul (58), de aceea şi fracţiunile proteice pot fi preparate într-o stare de puritate mai înaintată (100) (figura 39). Din gelul de agaroză proteinele pot fi recuperate cu randamente mai mari decît din agar, chiar prin extracţie simplă (tabelul nr. 9).

TABELUL NR. 9

Recuperarea proteinelor din gelurile de agar şi agaroză (în % din cantitatea totală) (după V. Gheţie şi colab., 1962)

Proteina eluată	Extracţie cu ClNa 0,145 M		Decongelare şi centrifugare	
	agar	agaroză	agar	agaroză
Albumină serică bovină	54	88	92	96
Proteină serică umană	64	96	96	98
Proteină citoplasmatică totală din ficatul de şobolan	36	60*	38	60

* Extracţia cu tampon Michaelis, izotonic, pH = 8,5, poate elua 90% din proteină.

Proteinele eluate pot fi eliberate de impurităţile de agaroză prin cromatografie pe DEAE-celuloză (100) (fig.19).

5. Precipitarea

Precipitarea cu săruri neutre (salifierea) (62) (107)

Sărurile neutre în concentraţii mari scad solubilitatea proteinelor, determinînd precipitarea lor. Acest efect este cunoscut sub denumirea de *relargage* (în literatura franceză) sau *salting-out* (în literatura engleză).

Deoarece fiecare proteină precipită la o concentraţie salină determinată, este principial posibil ca, dintr-un amestec complex de proteine, să se îndepărteze pe rînd fiecare component, adăugînd cantităţi variabile de săruri neutre. Simplitatea şi eficienţa metodei de precipitare cu săruri neutre o fac nelipsită în multe operaţii de purificare a antigenelor.

Scanned with OKEN Scanner

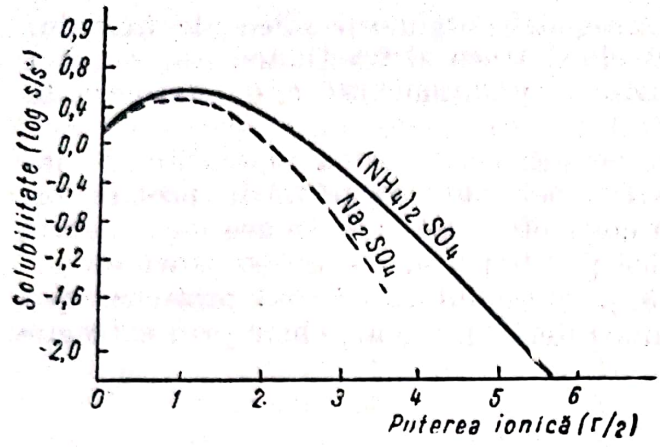


Fig. 22. — Solubilitatea hemoglobinei în soluții saline de putere ionică variabilă (după J. T. Edsall, 1947).

Teoria precipitării (41). Stabilitatea unei proteine este condiționată de repartiția și proporția grupărilor polare hidrofile și a grupărilor apolare hidrofobe, care aparțin aminoacizilor constituenți. Datorită grupărilor hidrofile, moleculele de apă se așază în jurul moleculelor proteice, determinînd hidratarea lor. Deoarece interacțiunea dintre grupele polare ale proteinei și moleculele de apă este mai mare decît cea dintre moleculele proteice învecinate, se produce de fapt solubilizarea proteinelor. Este cazul albuminelor solubile în apă distilată. O altă categorie de proteine nu sînt solubile decît în urma interacțiunii dintre grupele polare și ionii unor săruri dizolvate. Este cazul globulinelor, care nu se solvă decît în prezența unor cantități mici de săruri neutre.

Solubilitatea unei proteine crește cu puterea ionică numai într-o zonă relativ restrînsă de concentrație salină, trece printr-un maxim și apoi scade treptat, pentru a sfîrși prin anulare la puteri ionice mari (fig.22). De aceea, proteinele pot precipita în prezența unor cantități importante de săruri neutre.

Pentru concentrații saline mari, între variația solubilității unei proteine și conținutul în săruri, există o relație matematică :

$$\log S = \beta - K_s\mu,$$

unde S = solubilitatea ; β = constantă = $\log S$ (pentru $\mu = 0$) ; K_s = constanta de precipitare caracteristică pentru o proteină și o sare neutră dată ; μ = puterea ionică [1].

Reprezentarea grafică a acestei ecuații este redată în figura 23. După cum se observă în figură, constanta K_s reprezintă coeficientul unghiular al dreptei care exprimă variația logaritmului solubilității în funcție de puterea ionică. Mărimea K_s rămîne constantă chiar dacă pH-ul și temperatura variază. Ea depinde de natura proteinei și sarea neutră folosită.

[1] Puterea ionică se calculează după expresia :

$$\mu = \frac{1}{2} \Sigma\, C_i Z_i^2,$$

unde C_i = concentrația în moli la 1 000 g apă ; Z_i = valența fiecărui ion din soluție. Dacă concentrația se exprimă în moli la litru, în locul lui μ se scrie $\Gamma/2$.

Scanned with OKEN Scanner

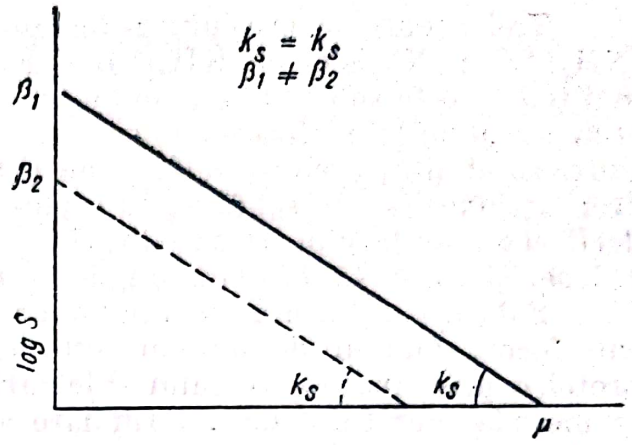


Fig. 23. — Variația solubilității unei proteine date cu puterea ionică, la concentrații mari de electrolit. Linia continuă : solubilitatea la un pH și o temperatură dată ; linia întreruptă : solubilitatea la alt pH sau temperatură.

Valoarea β este logaritmul solubilității ipotetice a proteinei obținută prin extrapolarea dreptei la $\mu = 0$. Din figură se observă că ea variază net în funcție de pH și de temperatură, exprimînd deci influența acestor factori asupra solubilității proteinei într-o soluție salină dată. De aceea, la precipitarea proteinelor cu săruri neutre este necesară menținerea pH-ului la o valoare optimă, care să permită cea mai eficientă separare a compușilor proteici dintr-un amestec. Practic, acest deziderat se realizează adăugînd soluții tampon adecvate la soluțiile proteice care urmează a fi fracționate.

Precipitarea proteinelor cu ajutorul concentrațiilor mari de săruri neutre se datorește deshidratării moleculei proteice de către moleculele sării adăugate. Datărită numărului lor mare și afinității lor accentuate pentru apă, ionii salini îndepărtează o cantitate atît de mare de apă de pe suprafața proteinelor, încît apa rămasă devine insuficientă pentru menținerea lor în soluție și acestea precipită. Procesul este reversibil. La diluarea cu apă a soluției, precipitatul se redizolvă, semn că nu s-a produs alterarea structurii moleculare.

Alegînd rațional concentrațiile saline utilizate, se poate fracționa mai mult sau mai puțin complet un amestec de proteine. Separarea nu va fi însă eficace decît în cazul proteinelor care prezintă o solubilitate mult diferită. Din această cauză, în mod curent nu se poate obține prin salifiere proteine pure. La o soluție cuprinzînd două proteine cu solubilitate net diferită, A și B, se poate adăuga o cantitate de sare neutră astfel aleasă, ca ea să determine precipitarea proteinei A și menținerea în soluție a proteinei B. Proteina A va fi însă impurificată de proteina B conținută în apa-mamă inclusă în precipitat, iar filtratul conținînd proteina B va fi și el impurificat cu o fracțiune din proteina A. Insolubilizarea totală a proteinei A cere concentrații de sare mai ridicate, care determină precipitarea parțială a proteinei B.

Agenții de precipitare. Alegerea unei anumite sări neutre este condiționată de următorii factori : *a*) sarea nu trebuie să reacționeze chimic cu proteina ; *b*) să aibă o solubilitate mare pentru a permite realizarea unor concentrații ridicate ; *c*) să nu modifice pH-ul soluției în care se dizolvă ; *d*) solubilitatea să nu varieze prea mult cu temperatura ; *e*) să poată fi separată ușor atît de proteina precipitată, cît și de cea rămasă în soluție.

Scanned with OKEN Scanner

Trei agenți de precipitare îndeplinesc satisfăcător toate condițiile: $(NH_4)_2SO_4$; Na_2SO_4 și $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$. Dintre aceste săruri, cel mai folosit este sulfatul de amoniu, datorită solubilității sale mari în apă, ceea ce permite realizarea unor puteri ionice foarte mari. Tocmai din cauza solubilității reduse sulfatul de sodiu este folosit pe o scară restrînsă, deși acțiunea sa de salifiere, la o putere ionică dată, este mai puternică decît cea a sulfatului de amoniu (fig. 23)(74). Tot din cauza solubilității reduse, și folosirea tamponului de fosfat de potasiu este limitată (34).

Folosirea sulfatului de amoniu are și dezavantaje. Prezența azotului sub forma ionului de amoniu nu permite determinarea concentrației proteice prin analiza azotului (kjeldahlizare); de asemenea interferează în metoda biuretului de determinare a concentrației proteice. Pentru a efectua aceste analize este necesară îndepărtarea prealabilă completă a ionului de amoniu (125)

Deoarece sulfatul de amoniu nu are decît o slabă putere de tamponare sub pH-ul 8, el este sensibil la adăugarea acizilor și bazelor. Din acest motiv pH-ul soluției de sulfat de amoniu trebuie ajustat la pH-ul la care se efectuează precipitarea, adăugînd cîteva picături de acid sulfuric concentrat (pentru acidifiere) sau amoniac concentrat (pentru alcalinizare). Măsurarea pH-ului nu trebuie efectuată direct în soluția concentrată de sulfat de amoniu, deoarece intervine eroarea salină. De aceea, după adăugarea acidului sulfuric sau amoniacului, se diluează soluția sub 0,3 M și apoi se măsoară pH-ul.

Fracționarea. Sînt două posibilități principale de adăugare a sărurilor la soluțiile proteice: adăugarea substanței solide și adăugarea soluției saturate. Indiferent de calea aleasă, sarea trebuie adăugată în porțiuni mici, iar soluția proteică trebuie agitată mecanic; se previne astfel crearea unor concentrații locale ridicate.

Soluția saturată de sulfat de amoniu se prepară dizolvînd la 25°C, 766,8g $(NH_4)_2SO_4$ în 1 000 ml apă. Această soluție este 4,1 M. Solubilitatea sulfatului de amoniu în apă variază destul de mult cu temperatura (tabelul nr. 10).

TABELUL NR. 10

Soluțiile saturate de sulfat de amoniu la diferite temperaturi

Temperatura (°C)	Grame de adăugat la 1 000 ml apă	Moli în soluție	Volumul aparent specific	Grame în 1 000 ml soluție
0	706,86	3,90	0,5262	514,72
10	730,53	3,97	0,5357	525,05
20	755,82	4,06	0,5414	536,34
25	766,80	4,10	0,5435	541,24
30	777,55	4,13	0,5458	545,88

Scanned with OKEN Scanner

Gradul de saturare în sulfat de amoniu al unei soluţii proteice se exprimă fie sub forma unei saturaţii fracţionale, fie sub forma unei saturaţii procentuale. În primul caz, valoarea soluţiei saturate este considerată 1, iar în al doilea caz 100.

Gradul de saturare se calculează ţinînd cont de schimbarea de volum a amestecului. Volumul X (în ml) al soluţiei saturate de sulfat de amoniu care trebuie adăugat la 100 ml dintr-o soluţie proteică, avînd deja saturarea fracţională S_1 pentru a obţine o saturaţie fracţionară S_2 se calculează după ecuaţia :

$$X = \frac{100\ (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

În locul soluţiei saturate de sulfat de amoniu, se poate adăuga şi substanţa solidă. Cantitatea Y (în g), care trebuie adăugată la 100 ml din soluţia proteică de saturare fracţională S_1, pentru a realiza saturarea S_2, se poate calcula astfel :

$$Y = \frac{0{,}1\ G\ (S_2 - S_1)}{1 - \frac{GV}{1\,000} \cdot S_2},$$

unde G = grame sulfat de amoniu în 1 000 ml soluţie saturată şi V = = volumul aparent specific. Ambele valori se scot din tabelul nr. 11.

TABELUL NR. 11

Fracţionarea cu sulfat de amoniu a proteinelor serice de cal (după E. J. C o h n şi colab., 1940)

Concentraţia în sulfat de amoniu		Tipul proteinei precipitate	Procentul de proteină precipitată		
moli/l	saturare procentuală		total	solubil în apă	insolubil în apă
1,39	34	γ-globulină (majoritatea)	20	71	29
1,64	40	γ-, β-, α-globulină	15	67	33
2,05	50	β-, α-globulina α-mucoproteine	14	94	6
2,57	62	albumine cristaline (majoritatea)	32	98	2
2,80	68	albumine cristaline, hemocupreina, glicoproteine şi unele enzime	14	99	1

În ambele cazuri, dacă fracţionarea se operează asupra unei soluţii proteice care nu conţine sulfat de amoniu, în relaţiile de mai sus S_1 se anulează.

Scanned with OKEN Scanner

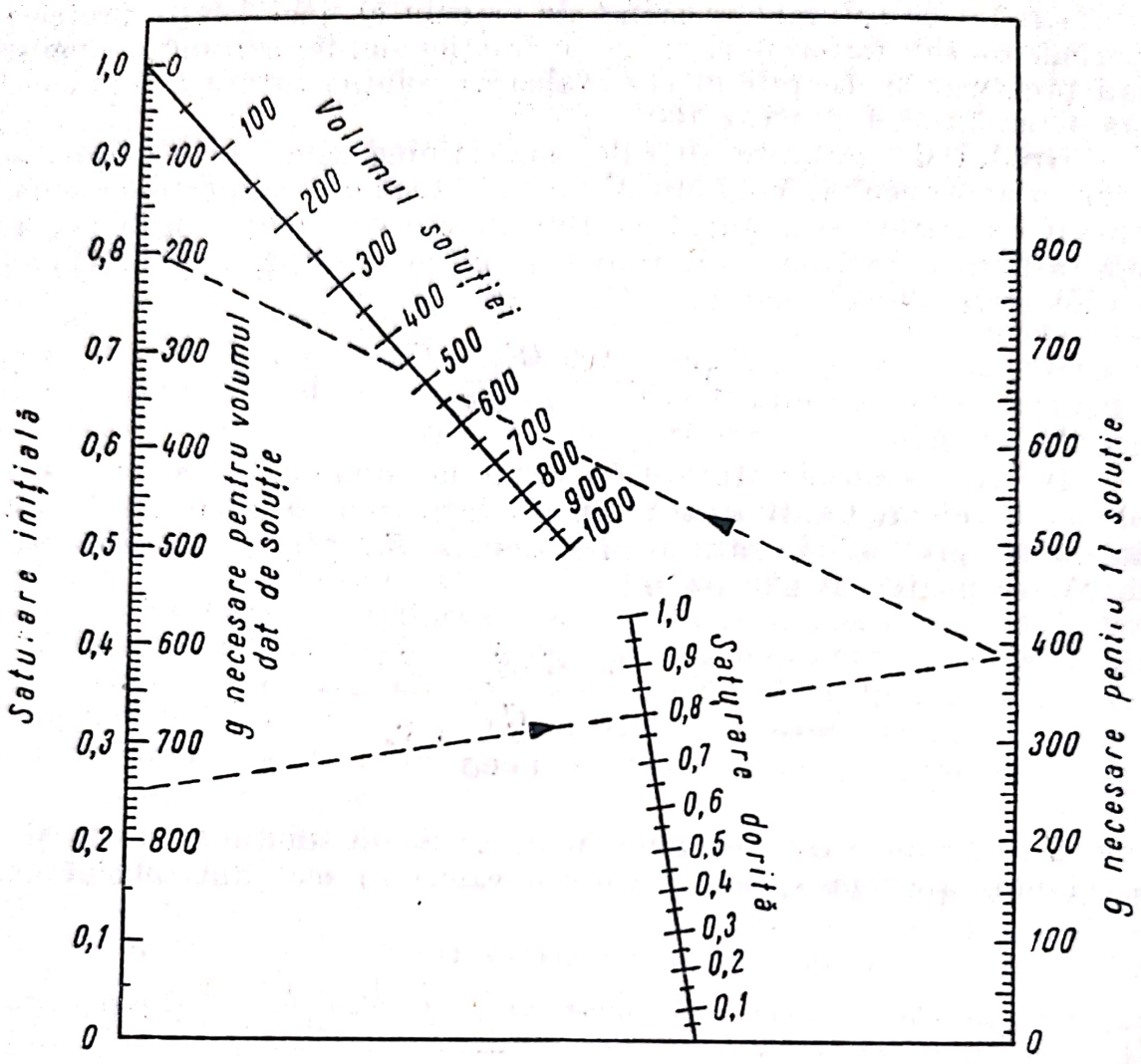


Fig. 24. — Nomogramă pentru calcularea cantității de sulfat de amoniu care trebuie adăugat la o soluție proteică pentru realizarea unei concentrații date la temperatura camerei. Linia dusă între saturația inițială și saturația dorită dă cantitatea de sulfat de amoniu solid care trebuie adăugat la 1 l de soluție proteică. Linia dusă din acest punct prin punctul care dă volumul existent din soluția proteică indică cantitatea de sulfat de amoniu care trebuie adăugată soluției proteice date (după M. Dixon și colab., 1958).

Calcularea cantității de sulfat de amoniu necesar salifierii proteinelor se poate face ușor, folosind nomograma arătată în figura 24.

Fracționarea cu sulfat de amoniu se face după următoarea schemă generală : soluția proteică se aduce, cu ajutorul unui tampon, la pH-ul dorit. Se adaugă apoi în porțiuni mici, sub agitare, soluția saturată de sulfat de amoniu, ajustată de asemenea la pH-ul dorit. Dacă volumul soluției nu trebuie mărit, se adaugă sulfat de amoniu solid. Și, în acest caz, sarea trebuie adăugată în porțiuni mici, avînd grijă ca întreaga cantitate să fie complet dizolvată.

Scanned with OKEN Scanner

După realizarea saturaţiei cuvenite, se lasă amestecul în repaus cel puţin 15 min, după care se centrifughează la 5 000—10 000 g. Precipitatul se reia apoi în cantitatea dorită de apă sau de tampon, iar din soluţia obţinută sulfatul de amoniu se elimină prin dializă sau filtrare prin gel. Aceste procedee servesc şi la desalifierea supernatantului.

În general precipitarea cu săruri neutre se efectuează la temperatura camerei (25°C). Deşi în aceste condiţii nu se produce denaturarea substanţelor proteice precipitate, totuşi, unii autori preferă temperaturi de precipitare mai joase (4°C). Trebuie avut în vedere că prin scăderea temperaturii se micşorează atît concentraţia soluţiei saturate de sulfat de amoniu, cît şi solubilitatea majorităţii proteinelor. De aceea, la 4°C fracţionarea proteinelor decurge diferit faţă de 25°C.

Aplicaţii. Precipitarea cu sulfat de amoniu a fost folosită la fracţionarea proteinelor serice (23), la pH = 6,0 şi temperatura camerei. Rezultatele sînt cuprinse în tabelul nr. 11.

Precipitarea cu sulfat de amoniu, ca şi cu alte săruri neutre, nu permite obţinerea unor fracţiuni proteice pure. Precipitarea fracţionată poate cel mult îndepărta anumite impurităţi, însă nu asigură puritatea absolută a preparatelor. Acest lucru rezultă clar din tabelul nr. 11, care arată că în cele 5 fracţiuni, componentele proteice se găsesc în raporturi variabile. Din această cauză, precipitarea cu săruri neutre este folosită ca o primă etapă de purificare a proteinelor, care realizează doar îmbogăţirea preparatului în proteina studiată. De aceea, precipitarea este de obicei urmată de metode de purificare mai eficiente (cromatografia pe schimbători de ioni, electroforeza preparativă etc.).

Folosirea sulfatului de amoniu la salifiere creează condiţii favorabile pentru cristalizarea substanţelor proteice. Astfel, s-a realizat separarea, purificarea şi cristalizarea proenzimelor proteolitice şi nucleotidice din pancreasul de bou (84). Este interesant de notat că, aplicînd criteriul electroforetic de puritate, unele din aceste enzime au fost găsite omogene.

Albumina serică de cal se obţine sub formă cristalizată prin următorul procedeu (1): 100 ml ser proaspăt de cal se diluează cu 100 ml apă distilată. Se adaugă apoi, în porţiuni mici sub agitare continuă, 200 ml sulfat de amoniu saturat. Precipitatul format se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantul se acidulează treptat, adăugînd picătură cu picătură, sub agitare, aproape 20 ml dintr-un amestec compus din 1 volum acid acetic 0,5 M şi 1 volum sulfat de amoniu saturat. Acidularea durează aproape o oră şi trebuie oprită în momentul în care s-a atins pH-ul 4,9 (pH-ul izoelectric al albuminei serice).

Cristalizarea albuminei serice începe încă în timpul acidulării şi se desăvîrşeşte lăsînd amestecul să stea peste noapte la temperatura laboratorului. Se separă apoi cristalele prin centrifugare şi se spală de 2—3 ori cu 200 ml dintr-o soluţie semisaturată de sulfat de amoniu tamponată (60 ml acetat de sodiu M + 40 ml acid acetic M + 100 ml sulfat de amoniu saturat). După ultima spălare, cristalele se reiau în 50 ml apă distilată, la care se adaugă 8 ml acetat de sodiu M pentru dizolvare completă apoi se filtrează. Se adaugă la filtrat un volum egal de sulfat de amoniu saturat. Se acidulează treptat, sub agitare, pînă la pH 4,9, prin adăugarea unui amestec compus din 1 volum acid acetic M şi 1 volum sulfat de amoniu saturat. Sînt necesari aproximativ 10 ml. Se lasă albumina să cristalizeze peste noapte, agitînd din cînd în cînd soluţia. A doua zi se separă cristalele din apele-mamă prin centrifugare şi se pot recristaliza din nou, repetînd operaţiile de mai sus. Două recristalizări sînt suficiente pentru a îndepărta urmele de globulină detectabile electroforetic (97), însă abia 5 recristalizări furnizează o albumină pură şi din punct de vedere imunochimic (77).

Scanned with OKEN Scanner

Precipitarea cu solvenţi organici (62) (107)

Teoria precipitării. Acţiunea precipitantă a solvenţilor organici se datoreşte în principal micşorării constantei dielectrice a soluţiilor proteice în urma adăugării solvenţilor.

Forţa electrostatică de atracţie dintre două molecule proteice de acelaşi fel se exprimă prin ecuaţia:

$$F = \frac{e_1 \, e_2}{D \, r^2},$$

unde e_1, e_2 = sarcinile opuse; D = constanta dielectrică a mediului, r = distanţa dintre cele două molecule învecinate.

Soluţiile apoase avînd o constantă dielectrică mare (aprox. 80) micşorează forţa de atracţie dintre sarcinile opuse ale moleculelor proteice învecinate, aşa încît acestea se pot păstra în soluţie. Adăugînd solvenţi organici cu o constantă dielectrică mică (eter = 4,1; etanol = = 25; metanol = 32), constanta dielectrică a mediului scade, forţa de atracţie dintre moleculele proteice creşte în mod corespunzător şi acestea pot să se unească formînd un precipitat.

Într-un amestec care conţine două proteine cu o încărcare electrică diferită, se va atinge forţa de atracţie limită care determină precipitarea fiecăreia în parte, la două valori diferite ale constantei dielectrice a mediului. De aceea, crescînd concentraţia de solvenţi în amestecul acestor două proteine, ele vor precipita pe rînd, făcînd posibilă separarea lor una de cealaltă.

Dacă încărcarea electrică, a celor două proteine este egală, atunci ele nu se vor putea separa, deoarece precipită la aceeaşi concentraţie de solvent. În aceste cazuri nefavorabile fracţionării, trebuie schimbate condiţiile de pH şi de putere ionică la care se efectuează precipitarea, ceea ce va face să apară diferenţe între încărcarea electrică a componentelor proteice, permiţînd astfel precipitarea lor la concentraţii diferite de solvenţi organici. *Din acest motiv, fracţionarea cu solvenţi organici se efectuează în soluţii tamponate avînd un pH bine determinat şi o putere ionică mică.* Aceste soluţii trebuie să aibă o putere ionică scăzută, pentru a nu creşte solubilitatea proteinelor.

Acţiunea solvenţilor organici este deci determinată de configuraţia electrică caracteristică pentru fiecare tip de proteină. De aceea, precipitarea cu solvenţi decurge diferit faţă de precipitarea cu săruri neutre, a căror acţiune depinde de factori mai puţin caracteristici, cum sînt dimensiunile şi forma moleculei.

Solvenţii organici nu acţionează însă numai asupra constantei dielectrice a mediului, ci intervin direct în procesele de solubilizare a proteinelor. Ei intră în competiţie cu proteinele pentru moleculele de apă, determinînd deshidratarea şi precipitarea lor.

Deoarece solvenţii organici au în general tendinţa de a denatura proteinele, toate operaţiunile de precipitare se efectuează la temperaturi

Scanned with OKEN Scanner

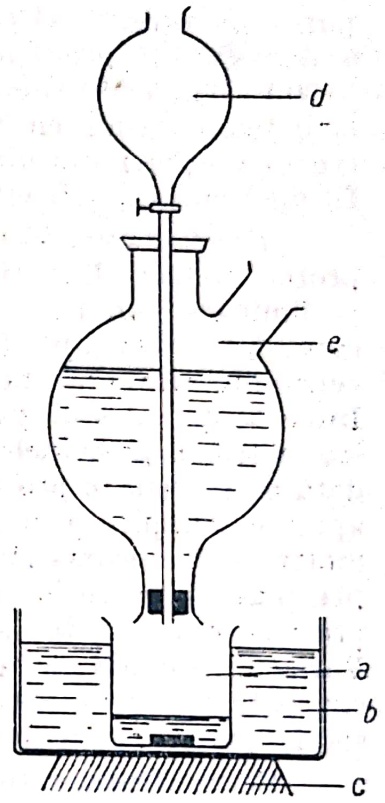


Fig. 25. — Aparatura pentru fracționarea proteinelor cu solvenți organici (după L. A. Zilber și colab., 1962).
a. Vas pentru soluție proteică; *b*, baia cu amestecul de răcire; *c*, agitatorul magnetic; *d*; pîlnia de separare pentru etanol; *e*, manșonul pentru răcirea solventului.

scăzute. Aceste temperaturi ajung sub 0° pe măsură ce crește concentrația solventului în mediu.

Pe măsură ce temperatura scade, solubilitatea proteinelor în prezența solvenților organici se micșorează considerabil. Acest fapt provoacă micșorarea cantității de solvent necesare precipitării unei proteine date, deci și atenuarea acțiunii sale denaturante.

Precipitarea fracționată a proteinelor dintr-un amestec se realizează prin creșterea concentrației în etanol, ajustarea corespunzătoare a pH-ului în apropierea punctelor izoelectrice ale proteinelor, cu menținerea puterii ionice la o valoare scăzută. În tot timpul precipitării, temperatura se menține scăzută pentru a proteja proteinele de acțiunea denaturantă a solvenților.

Cantitatea de alcool % (v/v)	8	10	15	18	25	40
Punctul de înghețare (°C)	−2,6	−3,4	−5,4	−6,8	−10,7	−23,0

Agenții de precipitare. Solvenții organici folosiți la precipitare se aleg în funcție de : *a*) măsura în care scad constanta dielectrică a mediului; *b*) solubilitatea în apă (capacitatea de deshidratare a proteinelor); *c*) acțiunea denaturantă asupra proteinelor precipitate. Îndeplinesc condițiile necesare etanolul (22), acetona (9), metanolul (39) și eterul (92).

Dintre acești agenți de precipitare, cel mai folosit este etanolul, cu toate că întrebuințarea acetonei și metanolului micșorează riscul denaturării proteinelor.

Instalația. Instalația pentru precipitarea proteinelor cu solvenți organici este constituită dintr-un vas pentru soluția proteică, prevăzut cu un agitator, cufundat într-o baie de răcire. Solventul se găsește într-o pîlnie de separare prevăzută cu un manșon pentru răcire (fig. 25).

La precipitarea cu etanol, în baia de răcire a vasului care conține proteina se introduce gheață la începutul experienței. Pe măsura adăugării etanolului peste soluția proteică, în baie se introduce gheață cu

punct de topire −5°C [1]. Cînd cantitatea de etanol din soluţia proteică a depăşit 12%, se înlocuieşte întregul amestec de răcire cu gheaţă de −10°C. Baia de răcire a pîlniei de separare este menţinută tot timpul la o temperatură cît mai scăzută, în funcţie de concentraţia etanolului (vezi corespondenţa dintre concentraţia în etanol şi punctul de îngheţare). În mod curent, solventul se răceşte cu gheaţă de −10°C.

Fracţionarea. Mersul unei fracţionări depinde de natura amestecului proteic folosit. Experimentatorul trebuie să stabilească prin experienţe preliminare condiţiile de pH, temperatura şi concentraţia de solvenţi care determină apariţia unui precipitat în amestec. Menţinînd apoi constante temperatura şi concentraţia solventului, trebuie variat pH-ul. Importanţa acestui parametru este determinată de faptul că punctul izoelectric al proteinelor variază considerabil. Astfel, pentru o concentraţie dată de solvent, o proteină solubilă la un pH oarecare poate fi precipitată aproape complet prin schimbarea pH-ului numai cu o unitate. Din acest motiv, este recomandabil ca fracţionarea cu solvenţi să înceapă la un pH mai mare decît cel mai alcalin punct izoelectric al componentelor proteice din amestec şi apoi să se scadă treptat în timpul fracţionării. Variaţiile de pH se asigură prin adăugarea soluţiilor-tampon, a căror concentraţie trebuie să fie cît mai joasă posibil, pentru a nu determina solubilizarea proteinelor.

Concentraţia proteică a amestecurilor supuse fracţionării trebuie să fie cît mai mică, pentru a elimina interacţiunea dintre componentele proteice, asigurînd astfel o separare mai bună. Acest deziderat nu se poate realiza în practică, deoarece implică manipularea unor volume prea mari, ceea ce ar cauza pierderi de substanţă şi denaturarea unor componente labile în soluţii diluate. De aceea, în mod obişnuit, concentraţia proteică se stabileşte între 1 şi 5 g%.

O atenţie deosebită trebuie acordată modului în care se adaugă solventul şi menţinerii unei temperaturi scăzute constante. Adăugarea foarte înceată a solventului, precum şi agitarea continuă a amestecului sînt necesare pentru a împiedica realizarea unor concentraţii locale mari de etanol, care pot denatura proteinele. Temperatura influenţează direct mersul fracţionării. Chiar o creştere de temperatură de 2—3° peste 0°C, timp de cîteva minute, poate avea o acţiune nedorită asupra solubilităţii produsului final şi al randamentului de obţinere. Menţinerea temperaturii în jur de −5°C trebuie prelungită şi repectată riguros şi în timpul centrifugărilor efectuate în scopul izolării precipitatelor. Precipitatele obţinute se reiau într-un solvent adecvat şi se pot concentra prin liofilizare, fără a mai fi necesară o dializă de lungă durată, ca în cazul precipitatelor obţinute prin salifiere.

---

[1] Amestecurile de răcire de mai sus se prepară prin congelarea unei soluţii apoase de clorură de sodiu 8 g% (gheaţa de −5°C) respectiv 16 g% (gheaţa de −10°C).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru ajustarea pH-ului se folosesc în general soluţii-tampon cu puteri ionice determinate. Mult folosite la precipitarea cu solvenţi organici sînt tampoanele acetat şi fosfat. Pentru prepararea acestora se pot folosi nomogramele prezentate în anexa III.

Aplicaţii. Fracţionarea cu solvenţi organici, în special cu etanol, a fost aplicată cu succes de E. J. C o h n şi colab. la proteinele plasmatice, sub formă a două variante cunoscute sub denumirea de metoda 6 (24) (66) şi metoda 10 (22).

III. CONCENTRAREA ANTIGENELOR

Concentrarea soluţiilor se aplică în două scopuri principale : *a*) creşterea cantităţii de antigen pe unitatea de volum ; *b*) obţinerea antigenelor sub formă solidă.

Creşterea concentraţiei antigenelor în soluţie este o operaţie care se practică în tot timpul purificării, deoarece de multe ori purificarea determină şi diluarea soluţiilor. Astfel, fracţionarea unui amestec de antigene prin electroforeză preparativă, cromatografie sau filtrare prin gel, atrage întotdeauna diluarea componentelor purificate, făcînd necesară concentrarea lor. Creşterea concentraţiei este impusă atît de faptul că o serie de metode analitice care servesc la controlul purităţii preparatelor se pot efectua numai cu soluţii concentrate, cît şi de faptul că prin concentrare se realizează o micşorare a volumelor, ceea ce uşurează manipularea lor şi creşte randamentul purificării. În plus pentru antigenele proteice, creşterea concentraţiei este necesară pentru a se evita denaturarea şi pierderea activităţii, fenomen care se petrece mai frecvent în soluţii diluate.

Concentrarea aplicată la sfîrşitul purificării are drept scop conservarea îndelungată a preparatului în vederea hiperimunizării animalelor. Ea se realizează de obicei prin liofilizare, metodă care asigură obţinerea antigenului sub formă solidă, fără pierderea proprietăţilor imunologice.

Concentrarea substanţelor într-o soluţie cu compuşi stabili, care rezistă la o temperatură moderată, se realizează prin simpla evaporare a apei sub influenţa temperaturii. Prelungind evaporarea, se poate aduce substanţa la sec, obţinînd-o în stare solidă. Acest procedeu rapid şi eficace larg răspîndit la concentrarea substanţelor termostabile, nu se poate aplica la substanţe termolabile ca proteinele. Îndepărtarea apei din soluţiile acestor substanţe trebuie realizată la temperaturi scăzute, folosind condiţii astfel alese, ca substanţele active să nu fie cu nimic afectate în procesul de concentrare. De aceea, concentrarea soluţiilor de antigene trebuie practicată cu grijă, controlînd dacă antigenele îşi păstrează proprietăţile iniţiale.

Concentrarea antigenelor proteice se poate executa prin operaţii folosite curent la purificare. Astfel, precipitarea proteinelor şi reluarea lor într-un volum mai mic este de fapt o concentrare. Dacă în cursul preci-

Scanned with OKEN Scanner

pitării se creează condiţii favorabile pentru cristalizare, se poate obţine substanţa chiar în stare solidă.

În mod obişnuit, pentru concentrare se folosesc metode elaborate exclusiv în acest scop. Metodele aplicate se împart în două categorii:

a) Metode care realizează concomitent cu concentrarea antigenelor şi concentrarea sărurilor şi a ionilor de hidrogen din soluţie (perevaporarea, liofilizarea). Deoarece antigenele se găsesc de obicei în soluţie de săruri şi nu în apă distilată, în urma eliminării apei creşte nu numai concentraţia lor, dar şi cea a sărurilor. Dacă se realizează o concentrare avansată, cantitatea de săruri sau de ioni de hidrogen poate deveni atît de mare încît să determine o precipitare a antigenelor proteice. De asemenea, există pericolul ca în soluţia proteică iniţială să fie agenţi chimici care, prin concentrare excesivă, să poată exercita o acţiune denaturantă asupra antigenelor proteice. Din acest motiv este recomandabil ca preparatele care urmează să fie obţinute în stare solidă (prin liofilizare) să fie în prealabil dializate, pentru îndepărtarea excesului de săruri. În caz contrar, preparatele solide vor fi puternic impurificate de săruri, putînd prezenta anomalii la dizolvare.

b) Metode care realizează concentrarea antigenelor cu păstrarea constantă a concentraţiei iniţiale a sărurilor şi ionilor de hidrogen (dializă faţă de compuşi cu greutate moleculară mare, ultrafiltrare, imbibiţia gelului). Conţinutul în săruri şi ioni de hidrogen a concentratului este identic cu al soluţiei iniţiale, deoarece în aceste cazuri există o trecere liberă a sărurilor prin membrana semipermeabilă a sacului de dializă sau de ultrafiltrare. Aceste metode sînt larg utilizate, deoarece îndepărtează o mare cantitate de lichid în unitatea de timp, folosind condiţii de lucru care asigură la maximum integritatea antigenelor. Totuşi, ele nu pot fi folosite la obţinerea antigenelor în stare solidă, deoarece nu permit îndepărtarea completă a apei din preparate decît în condiţii care le alterează. Pentru obţinerea antigenelor proteice sub formă solidă, uscată, într-o stare nedenaturată, singura metodă convenabilă rămîne liofilizarea. Unele polizaharide, mai puţin sensibile, pot fi obţinute sub formă complet uscată prin îndepărtarea apei cu solvenţi organici.

Influenţa umidităţii asupra conservării unor seruri este redată în tabelul nr. 12.

TABELUL NR. 12

Variaţia valorii protectoare a unor seruri imune liofilizate în raport cu umiditatea preparatelor (după S. Mudd şi colab., 1936)

Starea de conservare a preparatului	Umiditate (% apă)	Valoarea protectoare (în unităţi/ml)				
		iniţial	42 de zile	180 de zile	18 luni	3 ani
Lichid	—	550	550	45	—	—
Solid	0,5	550	550	550	550	550
Solid	5—8	550	45	insolubil*	—	—

* Umiditatea ridicată duce şi la pierderea solubilităţii preparatelor uscate.

Scanned with OKEN Scanner

Din datele tabelului se observă că serurile imune liofilizate, cu umiditate mare, își pierd activitatea mult mai repede decît serurile păstrate în stare lichidă la aceeași temperatură. De aceea, preparatele de antigene sau anticorpi uscate, trebuie ferite de umezeală, păstrîndu-le de obicei la rece peste $CaCl_2$.

1. Perevaporarea (45)

Perevaporarea este un procedeu de evaporare forțată a apei din soluții printr-o membrană semipermeabilă, utilizînd un curent de aer rece.

Tehnica de lucru este foarte simplă și poate fi aplicată în orice laborator. Soluția, care cuprinde substanța macromoleculară, se plasează într-un săculeț de celofan peste care se trimite un curent de aer provenit de la un ventilator sau suflător. Apa trece prin porii celofanului și se evaporă la suprafața acestuia, cu absorbție de căldură, așa încît se exclude pericolul degradării proteinelor prin încălzirea suprafeței de evaporare. Soluția supusă concentrării trebuie să fie în prealabil bine purificată de săruri sau alte substanțe cu greutate moleculară mică. Această măsură evită atît relizarea unor concentrații dăunătoare de săruri în soluția proteică, cît și depunerea sărurilor în porii celofanului cu micșorarea randamentului concentrării. Soluția supusă concentrării trebuie să aibă concentrația salină minimă care asigură solubilizarea întregii cantități de proteină. Operația trebuie executată într-o atmosferă lipsită de praf sau vapori dăunători (toxici).

O instalație simplă de perevaporare care funcționează cu un randament bun și care asigură o protecție maximă a proteinelor, este redată în figura 26.

Două pîlnii cantitative se așază cu conurile în prelungire și se etanșează cu o rondelă de cauciuc. În interiorul lor se suspendă un sac de celofan care conține soluția de concentrat. La capătul inferior al pîlniei se fixează un tub de cauciuc pus în legătură cu un suflător. Între cele două pîlnii și baia de răcire, se introduce gheață. Temperatura scăzută

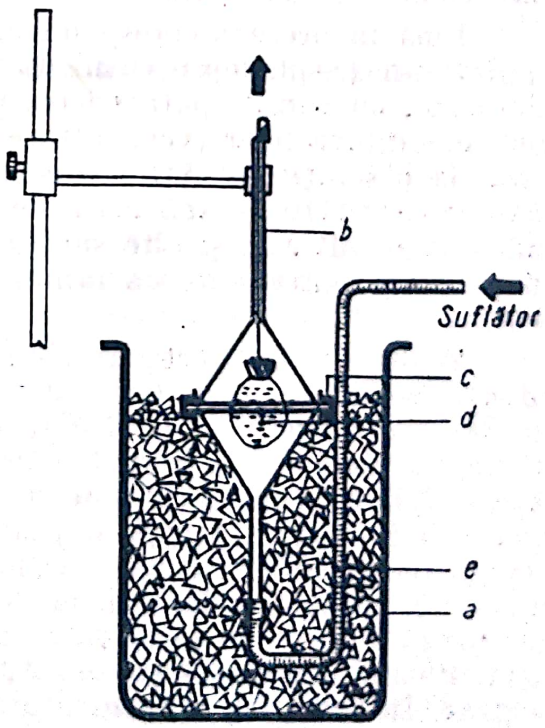


Fig. 26. — Instalație simplă pentru perevaporare la rece.

a, Baie de răcire; *b*, pîlnii suprapuse; *c*, rondelă de cauciuc pentru etanșare; *d*, sac de celofan cu soluția proteică; *e*, tub de cauciuc racordat la suflător.

Scanned with OKEN Scanner

răcește atît soluția proteică care se concentrează, cît și curentul de aer care vine de la suflător. În unele cazuri, din cauza temperaturii scăzute, soluția din sac poate îngheța. Randamentul concentrării depinde de mărimea sacului de celofan și a pîlniilor protectoare. Metoda este în special utilă la concentrarea rapidă a volumelor mici de soluție (5—10 ml).

Pentru volume mari este preferabilă concentrarea în vid, la rece, peste P_2O_5. Soluția proteică se așază pe o suprafață cît mai întinsă într-o cutie Petri, care se plasează la rîndul ei într-un exsicator de vid umplut cu P_2O_5. Se trage la vid, evitînd înspumarea soluției, și apoi exsicatorul se introduce într-un frigider în care se lasă peste noapte. Stabilind în prealabil cantitatea de apă care se pierde într-un timp dat de pe o suprafață cunoscută, se pot aduce soluțiile la un volum dorit.

2. Îmbibarea gelurilor uscate (49)

Dacă se introduce o cantitate oarecare de gel uscat într-o soluție, se constată că gelul se umflă, absorbind un volum dat din lichid. Mărimea volumului absorbit depășește de obicei greutatea gelului uscat, la îmbibare predominînd fenomene care sînt în legătură cu difuziunea și osmoza.

Această proprietate a gelurilor uscate poate fi exploatată în favoarea concentrării soluțiilor macromoleculare, cu condiția ca substanțele care absorb apa să îndeplinească următoarele cerințe : *a*) să se îmbibe rapid în apă ; *b*) să poată fi ușor și cantitativ separate de concentrat ; *c*) să fie insolubile și să nu contamineze concentratul ; *d*) să nu absoarbă substanța care trebuie concentrată.

Pînă în prezent corespund integral acestor cerințe gelurile pe bază de dextran (Sephadex). Gelul de Sephadex, chiar după îmbibare în mediul apos, nu admite pătrunderea moleculelor mari, în timp ce moleculele mici pot difuza liber (vezi filtrarea prin gel). Dacă se adaugă Sephadex uscat la o soluție se obține o concentrare a macromoleculelor corespunzătoare cantității de apă luată de gel prin îmbibare. În același timp sînt îndepărtate sărurile și alte substanțe cu greutate moleculară mică, astfel că pH-ul și puterea ionică rămîn aproximativ constante în timpul procesului.

Modul de lucru este simplu : la soluția care trebuie concentrată se adaugă Sephadex uscat (cel puțin 1 parte gel la 10 părți de soluție). Se formează o suspensie groasă care se scutură 10 minute, pentru a obține îmbibarea completă a gelului. Particulele îmbibate se separă prin centrifugare, aplicînd 5 000 g timp de 30 de minute. În acest fel, soluția se concentrează de 2—3 ori. Operația se poate repeta pînă la atingerea concentrației dorite. În general, în urma tratamentului cu Sephadex pierderile de substanță activă sînt mici, recuperările fiind în jur de 90% (pentru concentrări de 10—20 de ori). Se poate spăla de cîteva ori gelul depus cu o mică cantitate de apă sau de soluție salină, adăugînd apoi apele de spălare la concentrat. În acest fel, randamentul recuperărilor este mai mare.

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece unele proteine cu greutate moleculară relativ mică pot rămîne fixate în gel (citocromul c, fosfataza din *E. coli* etc.), este necesar ca la concentrarea unei proteine necunoscute să se facă experienţe preliminare pentru a stabili în ce măsură substanţa se absoarbe în gel. Din acest motiv, alegerea tipului de Sephadex trebuie făcută în raport cu greutatea moleculară a substanţei care se concentrează şi a impurităţilor care urmează a fi îndepărtate. Tipul de Sephadex cel mai des utilizat este G—25 grosier (50—100 mesh), care absoarbe apa şi substanţele cu greutate moleculară mai mică de 5 000.

După utilizare, Sephadex-ul se regenerează prin spălări repetate cu apă, etanol şi uscare la 80°C.

Eficienţa concentrărilor cu Sephadex este redată în tabelul nr. 13.

TABELUL NR. 13

Concentrarea celulazei cu Sephadex G-25 (50—100 mesh) (adaptat după P. Flodin şi colab., 1960)

Nr. concentrărilor	Volumul (ml)	Activitatea enzimatică (unităţi/ml)	Recuperare (%)
Iniţial	7 500	0,53	—
1	3 045	1,25	94,7
2	1 130	3,82	
3	410	8,48	87,0

3. Concentrarea prin dializă şi ultrafiltrare

Dializa faţă de substanţe cu greutate moleculară mare

Prin dializa unei soluţii proteice faţă de soluţia concentrată a unei substanţe cu greutate moleculară mare, se creează de o parte şi de alta a membranei de celofan un dezechilibru osmotic care va determina trecerea unei cantităţi de apă şi de electroliţi din soluţia proteică în compartimentul conţinînd substanţele cu greutate moleculară mare. Deoarece proteinele nu pot traversa membrana de celofan, ele se concentrează în soluţia supusă dializei. În schimb, sărurile şi alte substanţe cu greutate moleculară mică trec liber prin membrană, aşa că la sfîrşitul operaţiei soluţia îşi va păstra salinitatea iniţială.

Substanţele care produc efectul osmotic ce determină concentrarea trebuie să aibă o greutate moleculară suficient de mare pentru a nu trece prin porii membranei de celofan. În caz contrar, ele vor impurifica soluţia care se concentrează. Se pot folosi în acest scop o serie întreagă de substanţe: polietilenglicolul (Carbowax 20 M, Union Carbid and Carbon Comp.

Scanned with OKEN Scanner

USA) (81) (110) (94), polivinilpirolidona (110), dextranul (4), celuloza (Cellugel Super 3 000, Swenska Cellulosa Aktieholaget, Essvik, Suedia [1]) (105), carboximetilceluloza (105), guma arabică (99), ficolul [2] etc.

Viteza de concentrare a soluţiilor proteice depinde de greutatea moleculară a substanţei folosite şi de concentraţia ei. La aceeaşi concentraţie procentuală, substanţele cu greutate moleculară mai mică vor efectua o concentrare mai rapidă, deoarece au o presiune osmotică mai mare (concentraţie molară mai mare). De aceea, polietilenglicolul, cu greutatea moleculară 6 000 (Carbowax 6 000), produce o concentrare mult mai rapidă decît polivinilpirolidona cu greutatea moleculară 40 000. În schimb, polietilenglicolul trece parţial prin membrana de celofan, ceea ce poate constitui, în unele cazuri, un inconvenient [3]. Polivinilpirolidona, ca şi Cellugelul Super 3 000, nu trece prin membranele de celofan (110) (105).

Instalaţia pentru concentrarea soluţiilor proteice este simplă : se introduce soluţia de concentrat într-un tub de celofan [4] şi acesta se imersează în soluţie foarte concentrată de polivinilpirolidonă (100 g/100 ml) sau de altă substanţă şi se lasă la frigider un timp limitat, necesar pentru atingerea concentraţiei proteice dorite. Raportul dintre volumul soluţiei proteice şi cel al soluţiei concentratoare trebuie să fie de cel puţin 1 : 5. Sacul de celofan cu soluţia proteică poate fi introdus direct chiar în substanţa concentratoare uscată, asigurînd un contact cît mai bun între membrană şi substanţă. În acest caz, cantitatea de substanţă trebuie să fie 1 : 5—1 : 10 din cantitatea de apă pe care trebuie s-o scoată din soluţia proteică.

Ambele variante au un dezavantaj important : nu permit controlul concentrării, de aceea de multe ori soluţiile proteice se concentrează prea mult, ajungînd chiar pe sec. Această incomoditate a metodei este complet eliminată printr-un aparat simplu, care asigură automatizarea procesului (81) (fig. 27).

Lichidul care conţine proteina se plasează într-un vas de sticlă care are la partea sa inferioară o protuberanţă cu un volum egal cu cel la care trebuie adusă soluţia supusă concentrării. Mărimea vasului şi a protuberanţei depinde de volumul iniţial supus concentrării şi de volumul final, la care experimentatorul doreşte să ajungă.

---

[1] Cellugelul se foloseşte numai după o tratare prealabilă : se suspendă în etanol 70%, folosind un agitator cu turaţie mare ; se îndepărtează etanolul prin filtrare peste o pîlnie Büchner. Operaţia se repetă pînă ce reacţia pentru clor este negativă în filtrat. Se tratează apoi cu etanol şi acetonă şi se usucă peste noapte la temperatura camerei.

[2] Ficolul este un polimer sintetic, obţinut prin polimerizarea zaharozei ; nu are grupări ionizate şi are o mare solubilitate. Greutatea moleculară este de aproape 400 000. Este furnizat de Pharmacia, Uppsala.

[3] Acest inconvenient poate fi evitat folosind un polietilen-glicol cu greutatea moleculară 20 000 (Carbowax 20 M).

[4] Procedeele de concentrare prin dializă folosesc tuburi de celofan fără sudură, cu diametre variabile, livrate de firma Visking Corp., New York.

Scanned with OKEN Scanner

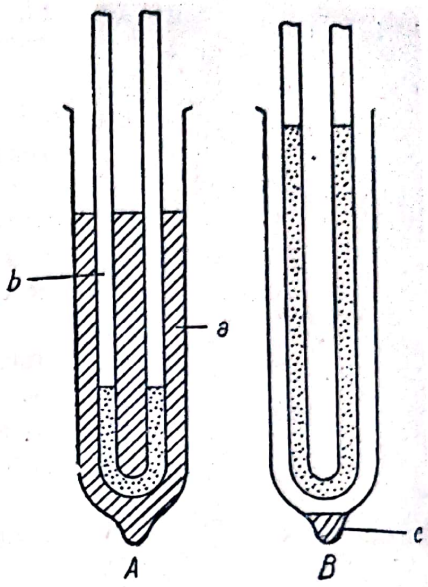


Fig. 27. — Aparat pentru concentrarea soluţiilor proteice. A, înainte de concentrare; B, după concentrare.
a, Lichid conţinînd proteina; *b*, tubul de dializă cu polietilenglicol; *c*, concentrat (după J. Kohn, 1959).

Se mărunţeşte polietilenglicolul şi o cantitate potrivit aleasă (minimum 1 parte polietilenglicol la 10 părţi de lichid) şi se introduce în tubul de dializă. Umplerea se face uşor, umflînd tubul şi folosind o pîlnie. Tubul umplut se îndoaie în formă de U şi se introduce în soluţia proteică. Este bine să se umezească polietilenglicolul în interiorul tubului cu o mică cantitate de apă chiar înainte de plasarea lui în soluţia proteică. Aparatul se introduce în frigider, iar procesul de concentrare încetează, desigur, în momentul în care lichidul conţinînd proteina atinge nivelul inferior al tubului de celofan. Volumul rămas depinde de capacitatea protuberanţei. Dacă se folosesc cantităţi mari de lichid, tubul de celofan poate fi îndoit de cîteva ori pentru a avea o suprafaţă de dializă mai mare şi pentru a accelera concentrarea. Cu o instalaţie simplă se pot concentra 10 ml lichid la 0,2 ml în 3-4 ore. Eficienţa maximă a metodei se asigură folosind un polietilenglicol fără apă, cu capacitate absorbtivă nealterată. În cursul concentrării nu se produce denaturarea proteinelor.

Ultrafiltrarea (136)

Ultrafiltrarea este o metodă de separare şi de concentrare a substanţelor cu greutate moleculară diferită, prin filtrare peste o membrană semipermeabilă. În cursul ultrafiltrării, membrana semipermeabilă lasă să treacă apa şi substanţele cu greutate moleculară mică, reţinînd în schimb substanţele macromoleculare. Din acest motiv, concentrarea soluţiilor se face fără modificarea compoziţiei ionice a mediului.

Ultrafiltrarea este strîns condiţionată de calitatea membranelor semipermeabile. Mai folosit este celofanul, deoarece poate fi sterilizat în autoclavă şi nu-şi astupă porii în cursul ultrafiltrării soluţiilor proteice. Ca şi pentru dializa de concentrare, celofanul folosit în majoritatea aparatelor de ultrafiltrare, trebuie să fie sub formă de tub fără sudură. Împingerea apei prin porii celofanului se realizează cu ajutorul unei presiuni pozitive sau negative. Presiunea pozitivă se asigură cu ajutorul unei bombe de azot prevăzută cu un reductor de presiune, iar cea negativă prin vid, realizat cu o pompă de ulei sau o trompă de apă (43).

Un aparat simplu, cu ajutorul căruia se realizează concentrarea soluţiilor apoase a substanţelor cu greutate moleculară mare, chiar pe

Scanned with OKEN Scanner

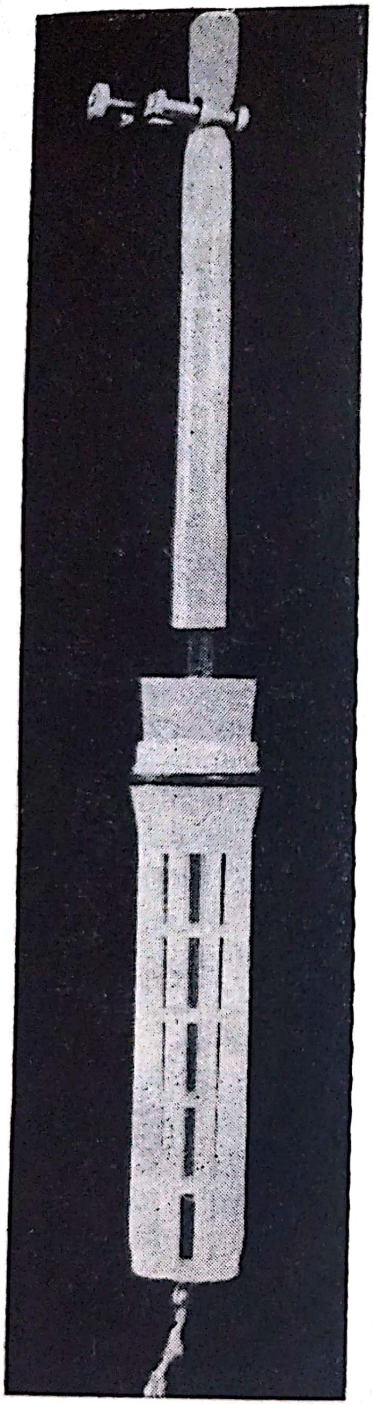


Fig. 28. — Ultrafiltrul LKB 6 300 A (LKB-Produkter AB, Stockholm, Suedia).

scară preparativă, este ultrafiltrul LKB 6 300 A (fig. 28). Procedeul nu modifică pH-ul şi puterea ionică a soluţiei supusă concentrării şi nu influenţează nefavorabil asupra compuşilor labili, prezenţi în lichidul de concentrat.

Aparatul se compune dintr-un suport cilindric din material plastic (12,5/3,5 cm), peste care se întinde un tub de celofan înmuiat în prealabil în apă. Se răsuceşte partea inferioară a tubului de celofan şi se închide printr-un nod dublu. Partea superioară se etanşează la suport cu ajutorul unui inel de cauciuc. În partea deschisă a suportului se introduce un dop de cauciuc prevăzut cu un tub de sticlă. Acesta se prelungeşte printr-un tub de cauciuc pentru vid, prevăzut cu o clemă întrerupătoare. Aparatul se pune în legătură cu o trompă de apă (10-15 mm col. Hg) şi se imersează într-un cilindru gradat în care se găseşte soluţia de concentrat.

Apa şi substanţele cu greutate moleculară mică traversează membrana de celofan şi trec în interiorul aparatului, în timp ce concentraţia substanţelor cu greutate moleculară mare creşte continuu în lichidul din interior. Deoarece ultrafiltrarea încetează cînd nivelul lichidului din cilindru ajunge la partea inferioară a membranei de celofan, volumul final poate fi stabilit dinainte, aşezînd aparatul cu partea sa inferioară pînă la nivelul volumului dorit. Debitul de filtrare este de aproximativ 14 ml/oră pentru apă, cînd este imersată întreaga suprafaţă filtrantă a aparatului.

Concentrarea soluţiilor se poate realiza menţinînd în permanenţă vidul sau aplicîndu-l numai la început şi închizînd apoi tubul de cauciuc. În ultimul caz ultrafiltrul poate fi plasat într-un frigider, filtrarea oprindu-se în momentul cînd aparatul este aproape complet umplut. Pentru concentrarea unor volume mari de soluţie se pot monta în serie mai multe ultrafiltre şi conecta la aceeaşi trompă de vid. Aparatul de ultrafiltrare poate fi întrebuinţat de mai multe ori fără schimbarea membranei, cu condiţia ca să se păstreze în soluţii de acid benzoic sau formaldehidă (pentru a proteja celofanul de atacul microorganismelor celulolitice). Dacă este necesar, înainte de întrebuinţare aparatul poate fi sterilizat.

Scanned with OKEN Scanner

4. Liofilizarea * (51) (52)

Liofilizarea este metoda uscării rapide a diferitelor substanţe labile, bazate pe îngheţarea şi sublimarea apei în vid.

Punctul de fierbere al apei la un vid de 4,6 mm col. Hg este de 0°C. Cum la această temperatură apa este solidificată, are loc o sublimare tipică. Această comportare stă la baza procedeului de liofilizare : soluţia apoasă este lăsată să se congeleze şi apoi se supune la un vid înaintat (0,01-2 mm col. Hg). Prin sublimarea apei în vid, soluţia se păstrează îngheţată, iar vaporii de apă se îndepărtează continuu şi se captează prin condensare pe o suprafaţă răcită.

Congelarea constituie prima etapă în liofilizarea unui produs biologic, avînd ca scop aducerea apei sub formă solidă. Totodată se opresc brusc procesele enzimatice sau alte procese care pot modifica starea nativă a materialului. Congelarea se poate efectua rapid sau lent. Congelarea rapidă foloseşte scăderea bruscă a temperaturii la — 170°C şi se aplică în special pentru ţesuturi, deoarece determină formarea cristalelor mici de gheaţă care nu alterează structura celulară. Congelarea lentă, care conduce la formarea cristalelor mari de gheaţă, se aplică în mod curent la preparatele proteice sau serurile imune.

A doua etapă a liofilizării, uscarea în vid, determină trecerea apei din formă solidă în formă de vapori (sublimarea), urmată de eliminarea vaporilor formaţi. Îndepărtarea vaporilor se realizează prin vid. Acesta înlătură vaporii de apă sublimaţi de pe suprafaţa materialului supus uscării, îndreptîndu-i sub forma unui curent continuu spre o suprafaţă răcită de condensare. În timpul uscării se deosebesc două faze. În prima, umiditatea produsului scade pînă la 5—6%. Ea necesită 1/3 din timpul total de liofilizare. În faza a doua are loc eliminarea umidităţii reziduale pînă la 0,1—1% din greutatea substanţei uscate.

Pot fi supuse liofilizării orice produse biologice, ca : ţesuturi şi celule vii, microorganisme, virusuri, seruri, proteine şi polizaharide purificate şi alte produse labile de origine animală sau vegetală.

Un aparat de liofilizare se compune din trei părţi principale (fig. 29) :

— Un recipient pentru substanţa supusă liofilizării („recipient de uscare"), confecţionat din sticlă sau material plastic, cu diferite forme (balon, flacon, fiolă etc.).

— Un dispozitiv de îndepărtare a apei („condensatorul" sau „trapa de răcire"), confecţionat din sticlă sau metal.

— O pompă de vid, principala piesă a aparatului, care trebuie să asigure un vid de 10^{-2} — 10^{-3} mm col. Hg.

Legăturile dintre cele trei părţi ale liofilizatorului trebuie să fie cît mai etanşe, cu diametrul cît mai mare şi cu lungimea cît mai mică. În acest fel se asigură o viteză de difuziune mare a vaporilor de apă prin condensator.

---

* Termen echivalent : uscarea prin congelare şi sublimare (freeze-drying).

Scanned with OKEN Scanner

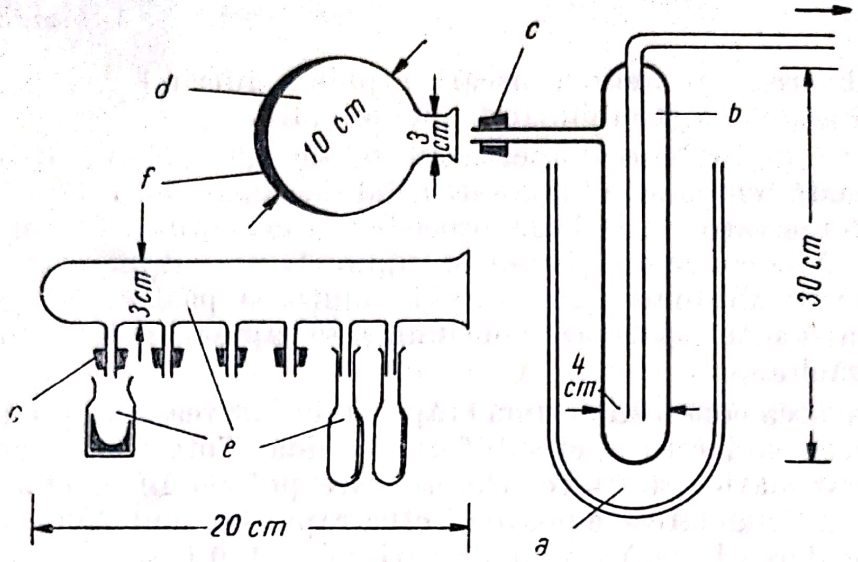


Fig. 29. — Schema de construcţie a unui aparat de liofilizare.
a, Vas Dewar; *b*, condensator (fixează cca. 200 ml apă); *c*, dopuri de cauciuc; *d*, recipient de uscare pentru o cantitate mare dintr-o probă unică; *e*, recipient de uscare pentru cantităţi mici din probe diferite; *f*, întinderea lichidului congelat în recipientul de uscare (adaptat după J. Loiseleur, 1954).

Liofilizarea are trei etape principale : *a*) pregătirea materialului supus liofilizării şi congelarea lui ; *b*) uscarea în vid ; *c*) închiderea recipientelor de uscare.

a) Materialul care urmează a fi liofilizat se introduce în recipientul de uscare. Se umple cu lichid numai 1/5 din volumul întregului recipient. Dacă materialul este steril, trebuie luate măsurile curente de asepsie. Se întinde lichidul pe o suprafaţă cît mai mare, pentru a favoriza sublimarea. Această operaţie se face rotind recipientul de uscare, cu mîna sau mecanic, într-un amestec de zăpadă carbonică [1] şi etanol (sau acetonă). Materialul trebuie să fie suficient de răcit pentru a nu se dezgheţa în timpul conectării recipientului la condensator.

b) Condensatorul este introdus într-un vas Dewar care este umplut cu un amestec de zăpadă carbonică şi etanol. Cînd temperatura a ajuns în jur de —60°C se conectează recipientul de uscare şi se porneşte vidul. Odată vidul stabilit, pierderea de căldură datorită sublimării păstrează materialul din recipientul de uscare sub formă îngheţată. Acest lucru se observă la puţin timp după începerea uscării, recipientul acoperindu-se cu chiciură. Pe măsură ce deshidratarea materialului se apropie de sfîrşit, chiciura se topeşte şi materialul ajunge la temperatura camerei. Pentru a avea un

[1] Zăpada carbonică se prepară uzual prin detentă în saci de pînză groasă. La duza unei bombe de bioxid de carbon, aşezată cu capul în jos, se fixează etanş o ţeavă de metal care se introduce în fundul unui sac de pînză legat la gură. Se deschide brusc, la maxinum, robinetul, lovind uşor în sac, pînă la formarea cantităţii dorite. Amestecul răcitor se face introducînd zăpadă carbonică în etanol (nu invers !) pînă se obţine o pastă groasă.

Scanned with OKEN Scanner

material cu umiditate sub 1%, este necesar ca din acest moment să se mai prelungească operaţia cîteva ore.

c) Se întrerupe legătura dintre condensator şi pompa de vid şi se lasă să intre încet aerul în sistem. Dacă preparatul trebuie menţinut steril, se introduce aerul numai după ce se fixează în prealabil un filtru pentru oprirea germenilor din aer.

Materialul liofilizat poate fi închis imediat la flacără, dacă el a fost liofilizat în fiole sau transvazat în recipiente sterile închise etanş cu dopuri de cauciuc (53). Deoarece materialele liofilizate sînt în general higroscopice, este necesară închiderea etanşă a preparatelor chiar în cazurile cînd nu trebuie asigurată sterilitatea produselor. Obişnuit, preparatele liofilizate nesterile se păstrează în exsicator peste $CaCl_2$ la rece.

O metodă simplă de liofilizare, care se poate aplica în orice laborator, este următoarea (78) : un exsicator, răcit în prealabil în frigider, se umple cu acid sulfuric concentrat sau granule de hidroxid de potasiu. Soluţia supusă liofilizării se toarnă într-o cutie Petri şi se îngheaţă brusc într-un amestec răcitor la — 20°C. Se trece imediat cutia Petri în exsicator şi se face vid cu o pompă de ulei. După obţinerea unui vid de 10^{-2} mm col. Hg se închide exsicatorul şi se lasă să stea la temperatura camerei sau în frigider. Prin acest procedeu, proteinele se obţin sub forma unui praf afînat, cu o structură poroasă, care se dizolvă repede şi complet în soluţii adecvate. Se pot concentra pînă la 50 ml soluţie în 24 de ore.

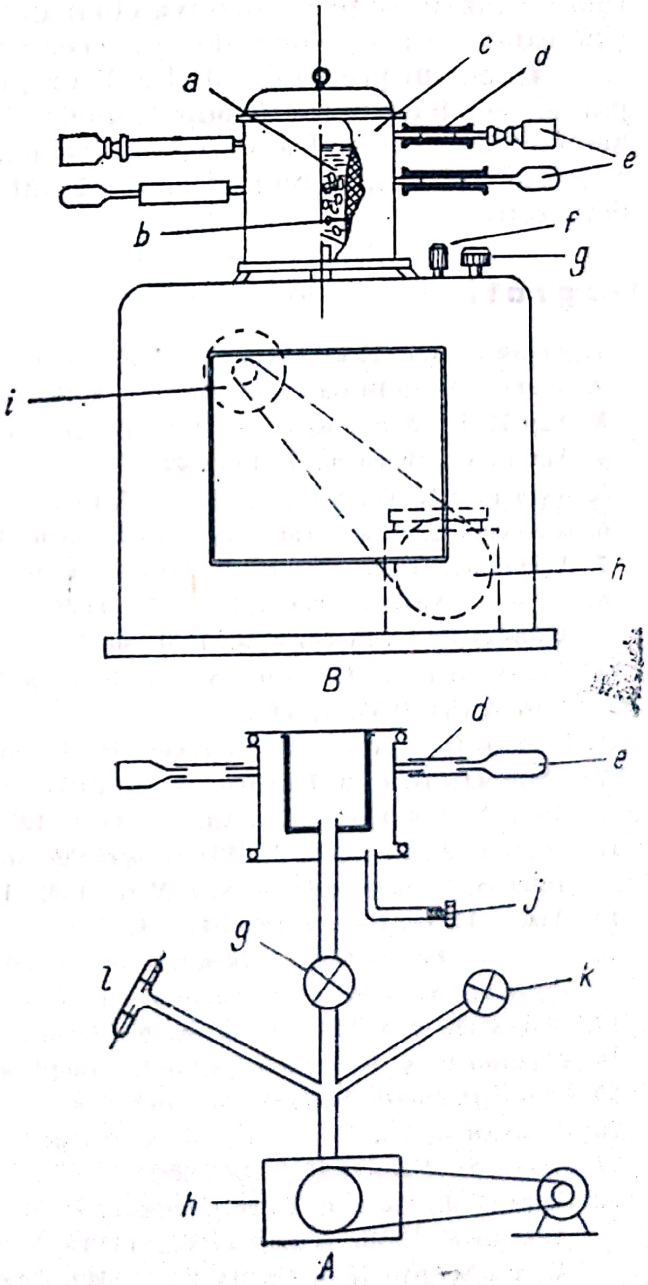


Fig. 30. — Liofilizatorul mic Usifroid MS 12. A, Schema aparatului; B, schema circuitului de vid.

a, Amestec de zăpadă carbonică cu etanol; *b*, condensator; *c*, cuvă; *d*, racord de cauciuc; *e*, flacoane; *f*, robinet pentru întreruperea vidului din pompă; *g*, clemă pentru izolarea cupei de pompă; *h*, pompă de vid; *i*, motor; *j*, dop pentru întreruperea vidului în cuvă; *k*, robinet pentru introducerea vidului în pompă; *l*, tub indicator de vid.

Scanned with OKEN Scanner

Există în prezent numeroase tipuri de liofilizatoare care permit uscarea unor cantităţi însemnate de soluţie, pot fi complet sterilizate şi permit măsurarea continuă a presiunii şi temperaturii. Un astfel de aparat este liofilizatorul mic Usifroid MS 12, care permite uscarea în 3—5 ore a 12 flacoane cu penicilină sau fiole umplute fiecare cu 2 ml soluţie (fig. 30).

Liofilizarea permite concentrarea diferitelor antigene din soluţii în condiţii de temperatură care asigură păstrarea proprietăţilor lor imunologice. În plus, temperatura joasă la care se efectuează sublimarea evită posibilitatea modificării structurii antigenice prin acţiunea enzimelor. Solubilitatea proteinelor este nu numai păstrată, dar chiar mărită în unele cazuri (gelatina liofilizată se poate dizolva chiar în apă rece). Materialul liofilizat conţine cantităţi foarte mici de apă, ceea ce permite o păstrare îndelungată.

În cursul procesului de liofilizare, unele substanţe proteice şi enzime pot să se denatureze (lipoproteinele tisulare şi serice, ceruloplasmine, hemocianine etc.). Da aceea, proteinele necunoscute vor fi testate sub raportul activităţii biologice, dacă suferă o influenţă nefavorabilă prin liofilizare.

Bibliografie

1. Adair G. S. a. Rceinson M. E., Biochem. J., 1930, **24**, 993.
2. Allfrey V., in Brachet J. a. Mirsky A. E., *The Cell*, Acad. Press, New York, 1959, **1**, 194.
3. Alm R. S., Williams R. J. P. a. Tiselius A., Acta Chem. Scand., 1952, **6**, 826.
4. Aly F. W., Biochem. J., 1954, **325**, 505.
5. Anderson N. G., Science, 1953, **117**, 627.
6. Anfinsen C. B. a. Haber E., J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1361.
7. Appel W., Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem., 1963, **330**, 193.
8. — Angew. Chem., 1963, **75**, 1128.
9. Askonas B. A., Biochem. J., 1951, **48**, 42.
10. Bernfeld P., in Colowick S. P. a. Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 1955, **1**, 149.
11. Biserte G., Laturaze J. et Havez R., Pathologie-Biologie, 1961, **9**, 1673.
12. Boardman N. R. a. Patridge S. M., Biochem. J., 1955, **59**, 543.
13. Bock R. M. a. Ling N. S., Analyt. Chem., 1954, **26**, 1543.
14. Bodman J., în Smith I., *Chromatographic and electrophoretic techniques*, Heineman and Intersci, Publ., Londra — New York, 1962, **II**, 190.
15. Boman H. G., Nature, 1955, **175**, 898.
16. — *Ion exchange chromatography of proteins and some applications to the study of different phosphoesterases*, Almgvist and Wiksells Boktr., Uppsala, 1958.
17. Boman H. G. a. Hjerten S., Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 1962, 276.
18. Börning H. u. Richter G., Biochim. Biophys. Acta, 1961, **49**, 599.
19. Carnegie P. R., Nature, 1961, **192**, 658.
20. Cochran G. W., Chipester J. L. a. Stocks P. L., Nature, 1957, 180, 1281.
21. Cohen S., Nature, 1959, **183**, 393.
22. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derouaux G., Gillespie J. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittleman D., Mouton R. F., Schmid K. a. Uroma E., J. Am. Chem. Soc., 1950, **72** 465.

Scanned with OKEN Scanner

23. Cohn E. J., McMeekin T. L., Oncley J. L., Newell J. M. a. Hugues W. C., J. Amer. Chem. Soc., 1940, **62**, 3386.
24. Cohn E. J., Strong L. E., Hugues W. C., Mulford D. J., Ashworth J. N., Melin M. a. Taylor H. L., J. Ame. Chem. Soc., 1946, **68**, 459.
25. Cohn M., Wetter L. R. a. Deutsch H. F., J. Immunol., 1949, **61**, 283.
26. Cole R. D., J. Biol. Chem., 1960, **235**, 2294.
27. Commoner B., Shearer G. B. a. Strode C., Proc. Natl. Acad. Sci., 1958, **44**, 117.
28. Craig L. C. a. Konigsberg N., J. Phys. Chem. 1961, **65**, 166.
29. Cramprton C. F., Moore S. a. Stein W. A., J. Biol. Chem., 1955, **215**, 787.
30. Creaser E. H. a. Taussig A., Virology, 1957, **40**, 200.
31. Depieds R., Cartouzou G., Gignoux D. et Mante-Bouscayrol S., C. R. Soc. Biol. 1961, **155**, 1966.
32. Depieds R., Cartouzou G., Gignoux H. et Cartouzou C., C. R. Soc. Biol. 1962, **156**, 1444.
33. Depieds R., Cartouzou G., Lissitzky S., Gignoux H. et Gignoux D., C. R. Soc. Biol. 1962, **156**, 1450.
34. Derrien Y., Biochim. Biophys. Acta, 1952, **8**, 651.
35. Deutsch H. F., Stiehm E. R. a. Morton J. L., J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2216.
36. Di Castro G. a. San Marco M., J., Am. Chem. Soc., 1954, **54**, 4657.
37. Dixon M. a. Webb E. C., *Enzymes*, Longmans, Londra, 1958, 53.
38. Drake B., Arkiv Kemi, 1955, **8**, 1.
39. Dubert J. M., Slizewicz P., Rebeyrotte P. et Macheboeuf M., Ann. Inst. Pasteur, 1953, **84**, 370.
40. Durrum E. L., J. Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 4875.
41. Edsall J. T., Adv. Prot. Chem., 1947, **3**, 384.
42. Eijk H. G. van, Monfoort C. H., Witte J. J. a. Westenbrink H. G. K., Biochim. Biophys. Acta, 1962, **63**, 537.
43. Everall P. H. a. Wright G. H., J. Med. Lab. Technol., 1958, **15**, 259.
44. Fahey J. L. a. Horbett A. P., J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2645.
45. Farber K., Science, 1935, **82**, 158.
46. Faurer R., Fine J. M., Saint-Paul M., Eyquem A. et Grabar P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, **37**, 783.
47. Flodin P., *Dextran gels and their application in gel filtration*, Dissertation, Uppsala, 1962.
48. — J. Chromat ogr., 1961, **5**, 103.
49. Flodin P., Gelotte B. a. Porath J., Nature, 1960, **188**, 493.
50. Flodin P. a. Killander J., Biochim. Biophys. Acta, 1962, **63**, 403.
51. Flosdorf E. W., *Freeze-Drying*, Acad. Press, New York, 1949.
52. Flosdorf E. W. a. Mudd S., J. Immunol., 1938, **34**, 469.
53. — J. Immunol., 1935, **29**, 389.
54. Folch P. I. a. Tallis L., *Blood cells and plasma proteins*, Acad. Press, New York, 1953, 378.
55. Gelotte B., J. Chromatogr., 1960, **3**, 330.
56. Gelotte B., Flodin P. a. Killander J., Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 1962, 1319.
57. Gheţie V. a. Buzilă L., Biol. Plant., 1964, **6**, 202.
58. Gheţie V. şi Moţet D., St. şi cerc. biochim., 1962, **5**, 409.
59. Gorin G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, **5**, 196.
60. Granath K. A. a. Flodin P., Makromol. Chem., 1961, **48**, 160.
61. Grassmann W. a. Hannig K., Naturwiss., 1950, **37**, 397.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL III-LEA. CONTROLUL PREPARĂRII ANTIGENELOR

OBŢINUTE la capătul unui proces de purificare, antigenele trebuie cercetate dacă sînt pure şi n-au suferit în cursul operaţiilor transformări care le-au schimbat structura nativă. Pentru controlul purităţii preparatelor nu există o metodă care, singură, să poată răspunde cu siguranţă dacă o proteină sau un polizaharid sînt alcătuite dintr-un singur fel de molecule sau conţin şi impurităţi. De aceea, pentru constatarea purităţii, preparatul se trece prin şirul unor probe analitice, ale căror rezultate coroborate pot furniza informaţii valabile asupra purităţii acestuia.

Constatarea denaturărilor în timpul operaţiilor de purificare se poate efectua mai uşor dacă se analizează un antigen dotat cu activitate biologică oarecare (enzimă, hormon etc.). Pierderea totală sau parţială a activităţii este un indiciu că manipulările au propus alterări în structura compusului izolat. Desigur, alterarea activităţii biologice nu trebuie să fie obligatoriu însoţită şi de modificarea structurii antigenice însă în multe cazuri o atare posibilitate trebuie să fie luată în considerare.

Mai complicat este controlul antigenelor lipsite de activitate biologică. La purificarea lor, eventualele modificări structurale se manifestă prin schimbarea unei proprietăţi fizico-chimice, ca : solubilitatea, viscozitatea, activitatea optică, apariţia unor grupări funcţionale noi (-SH) etc. Aceste semne indică de obicei alterări însemnate ale structurii moleculare, modificările structurale mici, care pot avea consecinţe asupra antigenicităţii native neputînd fi sesizate. Dificultatea de a aprecia în aceste cazuri efectul negativ al purificării asupra structurii native a antigenului studiat rezidă în faptul că nu se cunoaşte forma structurală sub care se găseşte antigenul în celule, ci numai forma lui după izolarea din celule. De aceea, nu se pot aprecia modificările produse în timpul izolării şi repercusiunile lor asupra antigenicităţii. Posibilitatea ca metodele de izolare să determine modificarea proprietăţilor fizico-chimice şi biologice ale antigenelor native nu este exclusă, de aceea controlul preparării antigenelor se limitează doar la examinarea purităţii preparatelor şi la eliminarea operaţiunilor care impietează în mod evident asupra structurii native a antigenelor.

Scanned with OKEN Scanner

I. PURITATEA ANTIGENELOR (38)

Un antigen este pur dacă este constituit din molecule de acelaşi fel. O proteină sau un polizaharid sînt entităţi chimice definite, fiecare moleculă a unei proteine sau a unui polizaharid fiind identică cu orice altă moleculă din aceeaşi proteină pură sau polizaharid pur (56). Deoarece moleculele identice nu pot fi separate una de cealaltă, rezultă că se poate dovedi puritatea unui preparat dacă el nu poate fi fracţionat (este omogen). Omogenitatea unui preparat se evidenţiază prin aplicarea mai multor metode analitice. Chiar dacă rezultatele unui număr variat de analize dovedesc puritatea (omogenitatea) unui preparat, ele nu exclud posibilitatea impurificării, ci cresc doar probabilitatea ca produsul respectiv să fie pur.

Dintre metodele analitice care servesc la stabilirea purităţii unui preparat proteic sau polizaharidic, cele mai utilizate sînt : metodele de solubilitate, determinarea secvenţei aminoacizilor, electroforeza, ultracentrifugarea, cromatografia (în special pe schimbători de ioni) şi metodele imunochimice. Fiecare din aceste metode aplică la analizarea preparatelor un criteriu diferit, ca : solubilitatea, compoziţia constantă în aminoacizi, sarcina electrică, greutatea moleculară, distribuţia grupărilor polare etc. De aceea, pentru a controla puritatea unui preparat este utilă aplicarea a 2-3 metode analitice care operează pe criterii diferite. Testele de puritate înfăţişate în acest capitol pot fi folosite la stabilirea purităţii unui preparat antigenic.

Dacă omogenitatea unui preparat, dovedită prin mai multe metode analitice, pledează pentru puritatea lui, în schimb eterogenitatea unui preparat proteic nu este un semn sigur că sînt prezente impurităţi. Fracţionarea unei proteine considerată pură nu înseamnă neapărat că ea conţine impurităţi, ci poate demonstra că această proteină este alcătuită din mai multe tipuri de molecule care pot îndeplini funcţiuni asemănătoare în organism.

Fracţiunile proteice separate în aceste cazuri pot prezenta diferenţe în structura primară (secvenţa aminoacizilor şi natura legăturii covalente) sau în structura secundară şi terţiară (configuraţia spaţială a moleculelor). Teoretic, o proteină, în care nu toate moleculele au aceeaşi secvenţă a aminoacizilor, poate fi separată în atîtea fracţiuni cîte tipuri de molecule cu secvenţă diferită există. Astfel, între hemoglobina A şi hemoglobina C, prezente în mod normal în sîngele uman, nu există decît o singură diferenţă, la nivelul unui aminoacid terminal. Hemoglobina A are acid glutamic, iar hemoglobina C, lizină. Această uşoară diferenţă determină însă o încărcare electrică diferită a celor două tipuri de molecule, permiţînd astfel separarea lor electroforetică.

Mai mult decît atît, o proteină omogenă din punct de vedere chimic, în care toate moleculele posedă aceeaşi secvenţă de aminoacizi şi aceeaşi legătură covalentă, poate să aibă teoretic un număr mare de configuraţii spaţiale diferite, fiecare avînd o proprietate fizică distinctă (izomer de configuraţie (63)).

Scanned with OKEN Scanner

Originea eterogenității proteinelor este variată :

a) Materialul biologic este recoltat de la mai multe animale. Acest procedeu se utilizează frecvent, deoarece în multe cazuri un singur animal nu conține cantități suficiente de antigen. Cum indivizi din aceeași specie pot produce proteine sau polizaharide în forme structurale diferite, rezultă clar că eterogenitatea preparatului poate reflecta eterogenitatea materialului. Astfel, în laptele de vacă colectat de la mai multe animale, se pot evidenția electroforetic două β-lactoglobuline distincte, A și B (3). Dacă se cercetează însă laptele colectat de la fiecare individ în parte, se constată că există animale care produc numai forma A, altele care produc numai forma B și, în sfîrșit, a treia categorie care sintetizează ambele tipuri. Diferența chimică dintre fracțiunea A și B constă, probabil, în două grupări carboxilice, conținute în plus de către β-lactoglobulina A (65). S-a stabilit că sinteza acestor proteine este determinată și controlată genetic.

Multiplicitatea formelor sub care poate exista o proteină dată în cadrul unei specii este cunoscută sub denumirea de polimorfismul proteinelor, datorită căruia, în cadrul unei specii există indivizi care posedă un tip de antigen care lipsește la alți indivizi (izoantigene). Cel mai cunoscut exemplu de izoantigene îl formează substanțele grupelor sanguine care determină împărțirea oamenilor în grupele sanguine A, B, AB și O. Evident, în acest caz este vorba de polimorfismul polizaharidelor, deoarece grupele sanguine își datorează specificitatea polizaharidelor conținute în eritrocite.

Există multe alte exemple de polimorfism, atît la nivelul antigenelor celulare (1), cît și al celor umorale. În tabelul de mai jos este redat polimorfismul proteinelor serice.

TABELUL NR. 14

Polimorfismul proteinelor serice (după B. Cinader, 1963)

Denumirea electroforetică	Altă denumire	Specia	Numărul minim de tipuri de molecule
Prealbumina	fracțiune care leagă tiroxina	maimuță	3
Albumina	—	om	2
α-globulina	—	,,	3
	haptoglobina	*Macaca irus*	2
	Gcl, GcS	om	2
β-globulina	β-lipoproteina cu densitate mare	,,	2
	transferina	șoarece	2
		oaie	5
		maimuță	7
		om	9
γ-globulina*	A_1,A_2,A_3,A_4,A_5,A_6	iepure	6
	MuA_1, MuA_2	șoarece	2

* Izoantigenele γ-globulinelor sînt denumite și alotipi (48).

Scanned with OKEN Scanner

Exemplele de mai sus dovedesc că o proteină dată poate fi produsă în mai multe forme moleculare, sinteza fiecărei forme fiind caracteristică unui grup de animale dintr-o specie dată.

b) Prezența în același animal a unei proteine date, sub forme moleculare diferite. Acest fenomen a fost observat în cazul enzimelor, formele moleculare dotate cu aceeași acțiune enzimatică fiind numite izozime (10). De exemplu, dehidrogenaza lactică există în țesuturile multor specii în 5 forme moleculare, distincte electroforetic (fig. 31).

Existența izozimelor (31) arată că o proteină poate fi produsă în mai multe forme moleculare chiar de către unul și același animal. Dar și proteinele lipsite de activitate biologică pot exista în mai multe forme moleculare, însă caracterizarea lor se face mai greu, existînd pericolul de a fi confundate cu artefactele care apar uneori în cursul fracționării. Aceste fapte cer o reevaluare a datelor vechi privind omogenitatea unor proteine și impun experimentatorului o extremă prudență în aprecierea originii eterogenității unui preparat purificat.

c) Manipularea și conservarea antigenului. În cursul purificării, o parte din molecule pot suferi modificări structurale. Datorită acestui fapt, în preparat pot să coexiste forma nativă cu cea denaturată; analizînd preparatul, el apare eterogen. Astfel, insulina purificată a putut fi separată prin cromatografie pe DEAE-celuloză în două fracțiuni : forma nativă și cea denaturată (70).

Pentru a verifica dacă eterogenitatea unei proteine este cauzată de existența ei în mai multe forme moleculare sau este determinată de manipulări, se urmărește comportarea proteinei date în extractele brute, obținute cu un minim de manipulare. Dacă proteina apare eterogenă în extractul brut, sînt șanse mari ca eterogenitatea proteinei purificate să nu fie cauzată de manipulare. Astfel s-a arătat că formele A și B ale ribonucleazei separabile din enzima cristalizată se găsesc și în extractele brute, obținute din pancreasul de bou (26), ceea ce dovedește că eterogenitatea este cauzată de prezența a două izozime și nu de manipulări.

În timpul păstrării, proteinele pot suferi modificări structurale, care se manifestă prin apariția eterogenității. Astfel, chimotripsinogenul, omogen prin cromatografie peste Amberlit IRC-50, manifestă eterogenitate în urma conservării. Păstrarea ribonucleazei liofilizate mai mult de o lună determină convertirea formei A în B (53). Se observă de asemenea o scădere a grupelor -SH în albumina serică în timpul păstrării (58). Soluțiile de γ-globulină, preparate din ser sau din placentă, prezintă eterogenitate dacă sînt păstrate un timp mai lung (59). Apariția eterogenității se datorește proteolizei spontane, cauzată probabil de plasmina care n-a fost îndepărtată complet în procesul de izolare a γ-globulinei (fig. 32). Scindarea γ-globulinei în soluție poate fi împiedicată timp îndelungat dacă se adaugă acid ε-aminocaproic în concentrație de 3 g % (60).

d) Condițiile de efectuare a testelor de puritate. Fiecare metodă analitică folosită pentru probarea purității unui material poate da și informații greșite cu privire la omogenitatea lui. Aceste greșeli survin

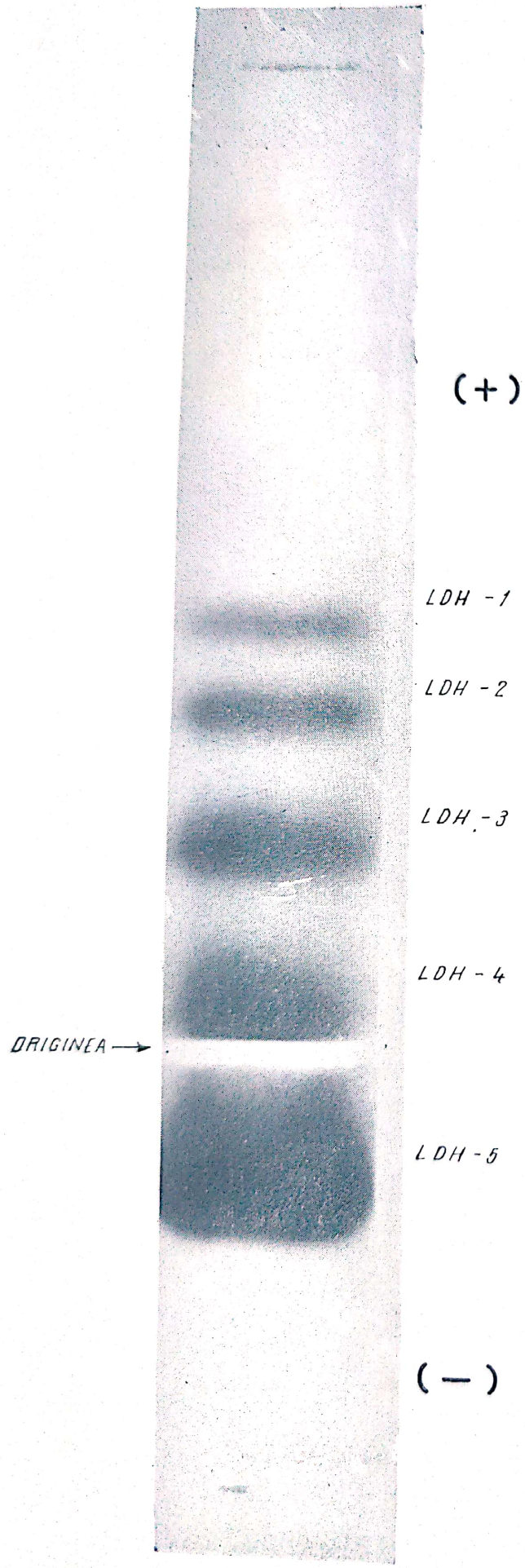


Fig. 31. — Separarea dehidrogenazei lactice prin electroforeză pe gel de amidon (după C. L. Markert şi colab., 1963).

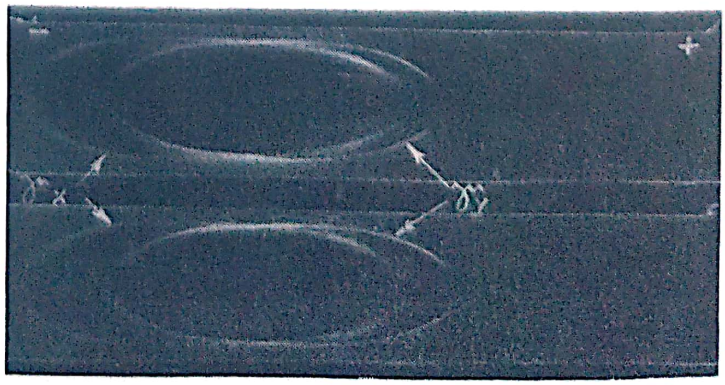


Fig. 32. — Scindarea γ-globulinei în timpul păstrării (după F. Skvaril, 1960).

Scanned with OKEN Scanner

mai ales la aplicarea unor condiţii de lucru necorespunzătoare, cînd apariţia artefactelor poate fi luată de experimentator drept dovadă a impurificării sau eterogenităţii materialului cercetat. Literatura de specialitate furnizează numeroase cazuri de acest fel. Cauzele care determină apariţia artefactelor sînt legate de specificul fiecărui test de puritate folosit. Ele vor fi înfăţişate la fiecare metodă analitică prezentată în acest capitol.

Cunoaşterea cauzelor care pot determina eterogenitatea permite adoptarea unei atitudini critice la constatarea eterogenităţii unei proteine obţinute la capătul unui proces de purificare. Există deci mai multe posibilităţi de control :

— Proteina n-a fost suficient purificată. Impurităţile sînt în cantitate suficient de mare pentru a putea fi evidenţiate de metoda analitică. Prin continuarea purificării, eterogenitatea preparatului scade datorită eliminării impurităţilor.

— Proteina a suferit modificări în timpul purificăriii sau păstrării. Se compară eterogenitatea proteinei purificate cu eterogenitatea ei în extractul brut. Se urmăreşte comportarea proteinei în cursul păstrării.

— Metoda analitică folosită pentru testarea purităţii a fost aplicată în condiţii experimentale care facilitează apariţia artefactelor. Se schimbă condiţiile de analiză şi se urmăreşte evoluţia eterogenităţii. Se compară datele furnizate de mai multe teste de puritate.

— Materialul biologic folosit a fost colectat de la mai multe animale. Se repetă purificarea, utilizînd un material provenit de la un singur animal.

Dacă aceste probe nu infirmă existenţa eterogenităţii, este probabil ca proteina să existe în materialul biologic folosit în atîtea forme moleculare distincte cîte fracţiuni se pun în evidenţă.

1. Testul solubilităţii

Metoda solubilităţii constante (25)

Această metodă se bazează pe faptul că în condiţii experimentale determinate, solubilitatea unei substanţe pure este constantă, indiferent de cantitatea de substanţă adăugată (44) (36).

Practic se procedează astfel : într-o serie de eprubete se amestecă un volum fix de solvent cu cantităţi diferite din substanţa care trebuie studiată. Se agită conţinutul fiecărei eprubete şi se lasă în repaus pentru a se atinge starea de echilibru. Se separă apoi faza solidă. În sfîrşit în fiecare eprubetă se determină cantitatea de substanţă dizolvată. Rezultatele se înscriu pe un grafic. Pe abscisă se trece cantitatea totală de proteină adăugată pe unitatea de volum, iar pe ordonată concentraţia substanţei dizolvate. Se pot obţine 3 tipuri de curbe, înfăţişate în figura 33.

O substanţă pură dă o curbă ABC. Între punctele A şi B nu există o fază solidă, deoarece se dizolvă întreaga cantitate adăugată. Între B şi C cantitatea dizolvată rămîne constantă şi apare faza solidă.

Scanned with OKEN Scanner

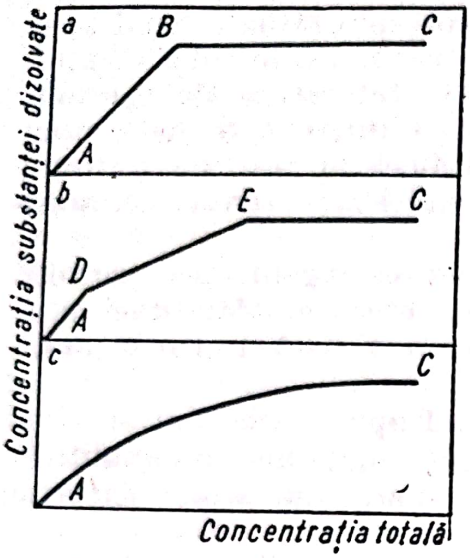


Fig. 33. — Curbele teoretice de solubilitate.
a, Substanța pură ; *b*, amestec de două substanțe ; *c*, amestec din mai multe substanțe care formează o soluție solidă.

Un amestec format din două substanțe cu solubilitatea diferită dă naștere unei curbe de tipul *ADEC*. Dacă între punctele *D* și *E* soluția este saturată numai cu una din componente, în schimb peste punctul *E* soluția se saturează în ambele componente, astfel că solubilitatea devine constantă.

Un amestec din mai multe substanțe care dau o soluție solidă formează o curbă ce variază continuu, apropiindu-se asimptotic de o valoare constantă. În aceste cazuri nu se poate trage o concluzie valabilă în legătură cu eterogenitatea materialului analizat.

La stabilirea curbelor de solubilitate trebuie respectate următoarele indicații practice :

— Se folosește ca solvent o soluție salină tamponată. Pentru chimotripsină s-a folosit sulfat de amoniu 40% saturat în tampon acetat 0,1 M de pH 4,0 (35). Compoziția chimică, pH-ul și concentrația molară a solventului se stabilesc la un nivel care asigură o solubilitate medie a proteinei cercetate. Astfel, se poate determina cu precizie satisfăcătoare concentrația proteinei dizolvate și nu se consumă o cantitate prea mare din proteină pentru saturarea soluției.

— De obicei, preparatele proteice conțin ioni în plus (impurități), diferiți de cei conținuți în solventul cu care se testează solubilitatea. Îndepărtarea acestor ioni se poate realiza astfel : se suspendă o cantitate dată din materialul proteic în solvent și se dializează 24 de ore sub agitare, evitînd înspumarea, față de o cantitate mare de solvent (24).

— Suspensia proteică dializată și bine omogenizată se distribuie în mai multe eprubete (aproximativ 10) în volume crescînde. Se completează apoi cu solvent pînă la un volum constant, astfel ales ca la echilibrare să existe eprubete în care întreaga cantitate de proteină să fie dizolvată și eprubete care să conțină un exces de proteină solidă.

— Eprubetele trebuie agitate fără înspumarea soluției (se pun 2—3 bile de sticlă pe fundul eprubetelor). Timpul exact necesar echilibrării soluțiilor se stabilește prin experiențe preliminare, care determină intervalul de timp în care concentrația proteică a eprubetelor cu un exces mic de proteină solidă devine constantă (nu mai crește). De obicei, o echilibrare nu depășește 3 zile. În timpul echilibrării, temperatura trebuie păstrată riguros constantă.

— Separarea fazei solide se realizează prin centrifugare sau filtrare. Supernatantul sau filtratul trebuie să aibă limpezimea apei.

Scanned with OKEN Scanner

— În supernatant, ca şi în suspensia omogenă dializată, se determină cantitatea de proteină. Cunoscînd volumul de suspensie adăugat în fiecare eprubetă, se poate calcula concentraţia proteică totală care, raportată la concentraţia proteinei din supernatant, permite trasarea curbelor caracteristice de solubilitate. Pentru determinarea concentraţiei proteice trebuie folosite metode precise, ca metoda Kjeldahl, determinarea spectrofotometrică la 280 mμ etc.

Metoda solubilităţii constante este un criteriu bun pentru testarea proteinelor însă necesită cantităţi destul de mari de proteină. În afară de aceasta, metoda are unele limite. De exemplu, un amestec de proteine poate da o curbă de tip *ABC* caracteristică proteinelor pure (fig. 33). Aceste cazuri rare pot interveni dacă amestecul de proteină formează o fază solidă care are o compoziţie identică cu faza lichidă. Pentru a evidenţia eterogenitatea acestor amestecuri, trebuie să se folosească mai mulţi solvenţi cu pH-uri şi puteri ionice diferite ; este puţin probabil ca fiecare component al unui amestec să fie afectat în mod egal de schimbarea făcută solventului. Aceste operaţii suplimentare consumă însă cantităţi însemnate de proteină. Poate tocmai din cauza consumului mare de proteină, testul stabilităţii constante este din ce în ce mai puţin folosit, fiind preferate metodele fizico-chimice mai economice.

Metoda solubilităţii constante rămîne însă un procedeu foarte sensibil de detectare a impurităţilor, care nu necesită o aparatură specială.

Metoda precipitării fracţionate (15) (14)

În această metodă se măsoară solubilitatea unei cantităţi constante de proteină într-o serie de soluţii cu puteri ionice variabile, volumul, pH-ul şi temperatura păstrîndu-se constante.

Se procedează astfel :

Într-o serie de eprubete se introduc volume egale din soluţia de sare în concentraţii crescînde. Intervalul dintre două concentraţii învecinate nu trebuie să depăşească 2% din concentraţia maximă folosită. Cel mai folosit agent de precipitare este amestecul echimolecular de fosfat mono- şi dipotasic 3,5 M, pH = 6,5 [1] (8). Se mai folosesc sulfatul de amoniu şi sulfatul de sodiu. În fiecare eprubetă se adaugă un volum fix din soluţia proteică analizată. Concentraţia proteică trebuie să fie în jur de 50 mg/ml. Se scutură amestecul la temperatură constantă (se preferă temperaturi în jur de 25°C) pînă la stabilirea echilibrului între proteina precipitată şi cea dizolvată. Echilibrarea durează cel puţin 12 ore.

[1] Amestecul se prepară astfel : 476 g KH_2PO_4 se dizolvă în 600 ml de apă distilată la 80—90°C. Se varsă această soluţie peste 609 g K_2HPO_4, clătind apoi recipientul cu 200 ml de apă. Se mai adaugă cca 500 ml de apă distilată şi se încălzeşte amestecul uşor, pînă la dizolvarea completă. Se răceşte la temperatura camerei şi se aduce într-un balon cotat la 2 l, folosind apele de spălare ale recipientelor. Se păstrează la 20°C. Sub 15°C poate cristaliza.

Scanned with OKEN Scanner

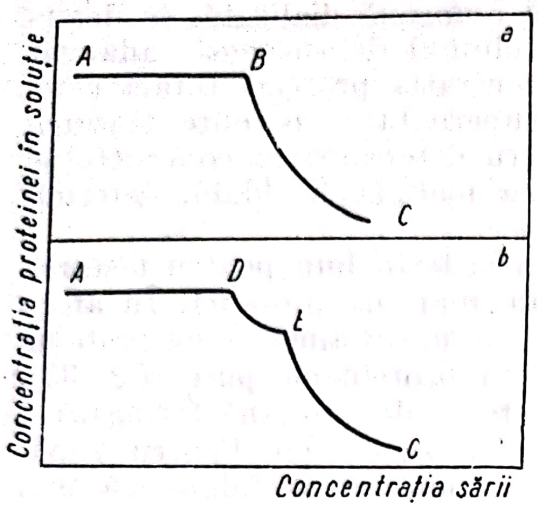


Fig. 34. — Curbele teoretice de precipitare.
a, Proteina pură; *b*, amestec de două proteine.

Se separă precipitatul prin filtrare sau centrifugare. Operațiile trebuie efectuate la temperatura de echilibrare. Supernatantul sau filtratul trebuie să fie perfect limpede. În soluțiile proteice rămase se determină concentrația, folosind metoda Kjeldahl sau alte metode cu sensibilitatea asemănătoare (dacă s-a folosit ca agent de precipitare sulfatul de amoniu). Rezultatele obținute se trec într-un grafic, punînd pe abscisă concentrația salină și pe ordonată concentrația proteică determinată. Se tratează astfel curbele de precipitare (*relargage*, *salting-out*).

Dacă se supune testului de precipitare fracționată o proteină pură, se obține o curbă similară cu cea reprezentată în figura 34. Porțiunea BC exprimă variația solubilității în raport cu sarea folosită; înălțimea porțiunii orizontale AB depinde de cantitatea de proteină și de volumul în care se găsește dizolvată. Lungimea segmentului AB depinde de natura sării folosite. Faza solidă apare în punctul B și cantitatea ei se mărește pe măsură ce concentrația crește.

Un amestec de două proteine prezintă două segmente diferite DE și EC, separate printr-un punct de tranziție caracteristic (E). La concentrația sării corespunzătoare acestui punct începe precipitarea celui de-al doilea component proteic din amestec. De aceea, curbele de precipitare pot fi folosite ca un model pe baza căruia i se aleg concentrațiile saline cu care se fracționează chimic un amestec de proteine (v. precipitarea cu săruri).

Prezența discontinuităților în curba de precipitare nu înseamnă întotdeauna că preparatul analizat este eterogen. Dacă o proteină omogenă se găsește în echilibru cu două faze solide, în funcție de concentrația sării, curba de precipitare manifestă discontinuitate (45). Aceste cazuri de eterogenitate aparentă pot fi distinse de cazurile reale, repetînd determinările cu o cantitate de proteină diferită. Dacă poziția punctului de tranziție (E) nu se schimbă, preparatul analizat este omogen.

Ca și metoda solubilității constante, metoda precipitării fracționate necesită cantități mari de proteină, de aceea este o metodă folosită mai rar ca test de puritate. În plus proteinele analizate nu trebuie să manifeste tendința de cristalizare în soluțiile saline folosite (61).

2. Testul electroforetic

Testarea purității prin electroforeză este larg utilizată, deoarece eterogenitatea electroforetică reflectă destul de fidel eterogenitatea chimică a unei proteine; metoda are o sensibilitate satisfăcătoare la dece-

larea compușilor aflați în cantitate mică și nu consumă decît cantități neînsemnate din materialul purificat.

Modificările în structura chimică care se reflectă în proprietățile electroforetice sînt: variații în secvența și compoziția aminoacizilor, variații în configurația spațială a moleculelor care afectează constantele de ionizare a aminoacizilor și calitatea și cantitatea glucidelor, acizilor nucleici și a altor substanțe care pot fi legate de proteină.

În aplicarea electroforezei, drept criteriu de puritate trebuie luate în considerare următoarele fapte:

a) La alegerea metodei prin care se testează puritatea trebuie să se țină seama că puterea de rezoluție electroforetică variază în funcție de metoda folosită. Electroforeza în zonă are, în general, o capacitate de rezoluție mai mare decît electroforeza liberă, în coloană de lichid. În plus, folosind medii de suport solide, se pot decela în preparatele proteice și impuritățile cu altă natură chimică (lipide, glucide, acizi nucleici etc.). Dintre toate mediile suport folosite, cea mai mare capacitate de fracționare o are gelul de amidon (26). Urmează apoi gelul de poliacrilamidă (54), agaroză (17) și agar (18)(21). Electroforeza pe hîrtie de filtru simplă sau de acetat de celuloză (34) are o putere de rezoluție similară electroforezei libere în coloană. La electroforeza liberă, sensibilitatea cu care se detectează impuritățile depinde de sistemul optic folosit. Astfel, sistemul Schlieren-Scanning (Longsworth) este mai sensibil decît sistemul Schlieren (Tiselius).

b) Testarea omogenității unui preparat trebuie făcută în tampoane cu o compoziție chimică diferită, la pH-uri și puteri ionice variabile. Nu se poate susține omogenitatea unui preparat numai pe baza unei analize efectuate cu un singur tampon la o singură valoare a pH-ului și puterii ionice. Chiar dacă două proteine au aceeași mobilitate electroforetică la un pH și o putere ionică date, este puțin probabil ca mobilitatea lor să rămînă neschimbată într-un interval larg de pH și putere ionică. De aceea, se poate afirma despre o proteină că este electroforetic omogenă numai dacă a fost analizată în tampoane diferite, la pH-uri și puteri ionice variabile.

Natura chimică a tamponului este importantă pentru punerea în evidență a impurităților. Dacă o soluție 2 g% de albumină serică umană este impurificată cu 0,01 g% globulină, impuritatea poate fi decelată efectuînd electroforeza liberă în tampon veronal de pH 8,0. Păstrînd acest pH, dar folosind tamponul fosfat, nu se poate evidenția globulina nici în cantitate de 0,04 g%.

Variația pH-ului poate evidenția eterogenitatea electroforetică a unui preparat considerat pur. Astfel, ovalbumina cristalizată, omogenă la pH 3,93 în tampon acetat, se fracționează în același tampon în doi componenți, însă la pH 5,34. Eterogenitatea electroforetică reflectă în acest caz eterogenitatea chimică a ovalbuminei: un component conține două grupări fosfat în moleculă, iar celălalt numai o singură grupare. Există și urme dintr-un al treilea component, care nu posedă în moleculă nici o grupare fosfat (50).

Scanned with OKEN Scanner

Puterea ionică a tamponului este de asemenea capabilă să releve eterogenităţi ascunse. Astfel, la puteri ionice mari ovomucoidul este electroforetic omogen. Dacă analiza se efectuează însă la puteri ionice scăzute (0,01, pH = 4,5) se constată rezoluţia ovomucoidului în cinci componenţi, cu un pH izoelectric distinct însă cu activitate tripsininhibitoare practic identică (16)(4). Deoarece în acest caz s-a lucrat la puteri ionice foarte scăzute, apariţia eterogenităţii poate fi determinată şi de apariţia artefactelor.

c) Rezoluţia electroforetică depinde şi de durata analizei. Un timp prea scurt poate să nu permită separarea unor componenţi cu o încărcare electrică sensibil apropiată, la pH-ul şi puterea ionică folosită. Astfel, pepsina analizată electroforetic la pH = 5,9 şi putere ionică 0,025 poate fi fracţionată în patru componenţi numai prelungind mult durata analizei (27).

d) Eterogenitatea electroforetică poate rezulta în urma scidării unui component unitar în două sau mai multe artefacte. Atari anomalii apar în special în cazul folosirii tampoanelor cu puteri ionice scăzute. De aceea, electroforegramele în aceste cazuri trebuie interpretate cu prudenţă.

Artefactele electroforetice pot apare în două împrejurări generale : proteina interacţionează cu ionii din tamponul folosit sau proteina prezintă reacţia de asociere-disociere.

Unele proteine au capacitatea de a lega un număr de ioni specifici, astfel că în soluţia tampon, concentraţia acestora devine practic nulă, iar schimbul ionilor legaţi între moleculele proteice se face foarte slab. În aceste cazuri, moleculele proteice care au prins ionii vor prezenta o mobilitate electroforetică distinctă faţă de moleculele care au prins ioni mai puţini sau de loc. Apare o falsă eterogenitate electroforetică. Astfel, albumina serică se separă în doi sau mai mulţi componenţi electroforetici dacă se analizează la pH 4,5 şi la puteri ionice mai mici de 0,02 (2)(55). Componentele separate sînt artefacte electroforetice, fiind cauzate, probabil, de legarea ionilor din tampon de albumină şi de izomerizarea acesteia.

Reacţiile de asociere-disociere care există la unele proteine conduc de asemenea la apariţia artefactelor. Agregarea unei substanţe pure poate să determine apariţia unei eterogenităţi electroforetice care evidenţiază în realitate unul şi acelaşi compus în grade diferite de agregare. În general, agregarea proteinelor se petrece numai în anumite intervale de pH. Astfel, β-lactoglobulina prezintă reacţia de asociaţie în intervalul de pH 3,50—5,25.

e) Eterogenitatea electroforetică reală a unei proteine poate fi diferenţiată de eterogenitatea cauzată de artefacte. În acest scop se izolează fracţiunile proteice separate electroforetic şi se supun, în aceleaşi condiţii experimentale unei noi analize electroforetice. Dacă fiecare component dă un singur maxim electroforetic înseamnă că eterogenitatea electroforetică este reală. Dacă fiecare component se desface în atîtea fracţiuni cîte avea şi proteina iniţială, eterogenitatea este cauzată de scindarea proteinei în artefacte (67).

Scanned with OKEN Scanner

3. Testul cromatografic

Eficienţa metodei cromatografice este determinată de faptul că separarea moleculelor se realizează atît pe baza diferenţelor în aranjarea spaţială a sarcinilor electrice pe moleculă, cît şi pe baza diferenţelor în dimensiunile moleculare. Astfel, două feluri de molecule care posedă aceeaşi densitate a sarcinilor pe suprafaţă, deci aceeaşi mobilitate electroforetică, vor putea fi separate prin cromatografie pe schimbători de ioni dacă au dimensiuni moleculare diferite. Separarea lor este posibilă deoarece condiţiile de eluţie sînt determinate de numărul de legături electrice care se formează între proteină şi schimbător. Molecula cu dimensiuni mai mari va forma mai multe legături electrice cu schimbătorul, de aceea va necesita condiţii de eluţie mai puternice. Invers, este posibil ca molecula cu o densitate diferită a sarcinilor să părăsească coloana cromatografică deodată, apărînd într-un singur maxim, dacă există o diferenţă compensatoare între dimensiunile lor moleculare. Din acest motiv, nu se poate stabili o corelaţie între condiţiile de eluţie şi mobilitatea electroforetică a proteinelor dintr-un amestec, însă aplicarea împreună a acestor două metode constituie un control eficient al purităţii unui preparat.

O proteină este considerată cromatografic omogenă dacă nu se poate fracţiona folosind condiţii de separare optime. Dificultatea principală în dovedirea omogenităţii unei proteine o constituie stabilirea condiţiilor optime de separare. Eterogenitatea unei proteine se dovedeşte mai uşor, în schimb necesită uneori experienţe suplimentare pentru eliminarea artefactelor.

La aplicarea testului cromatografic de puritate la un preparat, trebuie ţinut seama de următoarele indicaţii :

a) Alegerea schimbătorului de ioni. Se pot folosi schimbători pe bază de celuloză şi dextran (Sephadex). Nu este recomandabilă folosirea răşinilor schimbătoare de ioni pe bază de polistiren sau acid polimetacrilic. Ele au o capacitate mică pentru proteinele cu greutate moleculară mare. Densitatea mare a grupărilor încărcate pe suprafaţa răşinii determină legarea ireversibilă a unor proteine. Se favorizează astfel denaturarea lor, iar pentru disocierea proteinelor sînt necesare condiţii de eluţie destructive pentru structura lor nativă.

Schimbătorii celulozici au o capacitate de rezoluţie similară schimbătorilor Sephadex. Totuşi, în unele situaţii se pare că schimbătorii Sephadex au eficienţă mai mare. Astfel, aplicînd condiţii de eluţie identice, DEAE-Sephadexul (A-50) este capabil să fracţioneze γ-globulina în două componente, în timp ce DEAE-celuloza nu o poate fracţiona (57)(fig. 35).

Rezoluţia γ-globulinei este cauzată de caracteristicile specifice schimbătorului Sephadex, deoarece ea nu poate fi realizată prin amestecarea DEAE-celulozei cu Sephadex G-50 (57).

La testarea purităţii unei proteine trebuie folosiţi atît anioniţii, cît şi cationiţii. Şansele de a evidenţia impurităţile cresc considerabil prin aplicarea succesivă a anioniţilor (de ex. DEAE-celuloză) şi a cationiţilor (de ex. CM-celuloză).

Scanned with OKEN Scanner

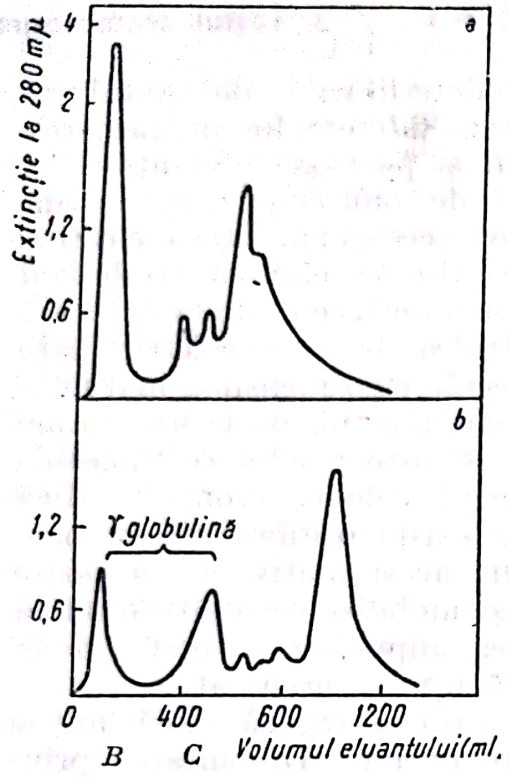


Fig. 35.— Cromatografia pe coloană a serului de iepure (coloana 33/2,3 cm; eluția în gradient s-a efectuat cu tampon-fosfat pH 8,0, 0,02—03 M; temperatura 4°C). a, DEAE-celuloză; b, DEAE-Sephadex (după M. Sela și colab., 1963).

Trebuie, de asemenea, acordată toată atenția dimensiunii particulelor schimbătorului. Particulele mari, grosiere, au o putere de rezoluție mai slabă decît particulele mici, fine, de aceea la testarea purității este preferabilă utilizarea coloanelor umplute cu schimbători de 200—400 mesh.

b) Aplicarea condițiilor de eluție. Analiza unui preparat se realizează prin schimbarea pH-ului și a puterii ionice a tamponului folosit în eluție. Modul în care se efectuează această schimbare nu este indiferent. Eluția prin gradient continuu este un mijloc mai fin de testare a purității, deoarece poate evidenția impurități aflate în cantități mici și permite o interpretare mai sigură a cazurilor de eterogenitate. În general, aplicarea eluției în etape (discontinuă) nu este recomandabilă la testarea purității unei substanțe, deoarece implică schimbări prea bruște în legarea proteinelor de schimbători, îngăduind astfel apariția artefactelor.

O proteină poate fi considerată omogenă numai dacă s-a manifestat ca atare în tampoane diferite, folosind un interval larg de pH și putere ionică.

c) Eterogenitatea cromatografică. Fracționarea unei proteine considerate pură, în două sau mai multe componente, se realizează în trei împrejurări diferite :

— Fracțiunile separate reprezintă impurități cu proprietăți cromatografice diferite de proteina principală.

— Proteina principală apare în mai multe piscuri cromatografice, datorită condițiilor nepotrivite sau greșelilor în analiză.

— Proteina principală există în mai multe forme moleculare. Dacă se cromatografiază o enzimă oarecare, se poate constata că activitatea enzimatică se regăsește în fiecare pisc cromatografic (cazul izozimelor). Cauzele acestei eterogenități au fost discutate la începutul capitolului.

Pentru a putea deosebi eterogenitatea cromatografică cauzată de artefacte de cea cauzată de existența formelor moleculare multiple (izozime), trebuie efectuată recromatografierea fracțiunilor separate în aceleași condiții de eluție. Dacă fiecare fracțiune dă la recromatografiere doar un singur maxim, sînt șanse mari ca proteina să existe în mai multe forme diferite.

Scanned with OKEN Scanner

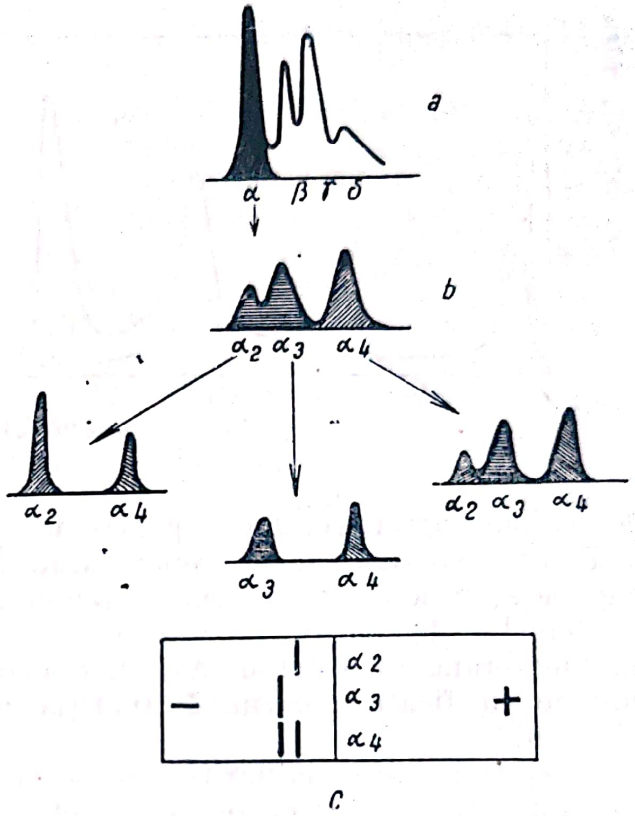


Fig. 36. — a. Cromatografia pe DEAE-celuloză; b, cromatografia pe CM-celuloză a catepsinei D izolată din splina de bou; c, analiza electroforetică a fracțiunilor separate pe gel de amidon (adaptată după E. M. Press și colab., 1960).

Astfel, la cromatografierea catepsinei D din splina de bou peste DEAE-celuloză, se constată separarea ei în patru fracțiuni, toate dotate cu activitate enzimatică (51)(fig. 36).

Cromatografierea fracțiunii α peste CM-celuloză evidențiază un grad de eterogenitate mai înaintat (α_2, α_3 și α_4). Fracțiunile α_2, α_3 și α_4 sînt dotate cu activitate cateptică. Pentru a stabili dacă α-enzima există în trei forme distincte sau dacă acestea sînt artefacte, s-au recromatografiat fiecare din fracțiunile izolate. S-a constatat că fracțiunea α_2 apare în două maxime, α_2 și α_4, fracțiunea α_3 în maximele α_3 și α_4 iar fracțiunea α_4 este un amestec din toate cele trei fracțiuni. Deci, fracțiunea α_4 este un artefact rezultat din combinarea fracțiunilor distincte α_2 și α_3. Această concluzie a fost confirmată și prin analiza electroforetică în gel de amidon a celor trei fracțiuni (fig. 36).

d) Condițiile experimentale care determină apariția artefactelor. Riscul de a obține aceeași substanță răspîndită în două sau mai multe piscuri cromatografice se mărește, dacă se comit următoarele erori experimentale:

— Supraîncărcarea coloanei. Atunci cînd cantitatea de proteină depășește capacitatea de fixare a schimbătorului, se obțin maxime care corespund la proteina ce nu a fost reținută de coloană. Invers, introducînd prea puțină proteină în coloană, separarea poate fi mediocră (5).

— Concentrația eluantului este prea joasă. În aceste cazuri poate interveni stricarea echilibrului dintre eluant și schimbător. Pentru a evita aceasta, echilibrarea schimbătorului cu tampon trebuie să dureze mai mult timp, prin spălarea coloanei peste noapte cu tamponul de începere a eluției. În plus, eluția trebuie făcută cu tampoane cationice pentru schimbători de ioni anionici și tampoane anionice pentru schimbători de ioni cationici.

— Denaturarea proteinelor în timpul cromatografiei. Uneori se constată că cromatografia la temperatura camerei face să apară o eterogenitate care nu se constată la temperaturi joase (20) (fig. 37).

Scanned with OKEN Scanner

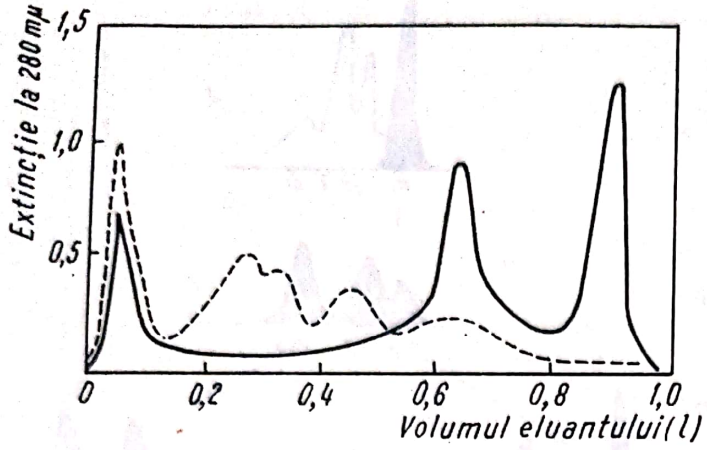


Fig. 37. — Cromatografia pe CM-celuloză a carboxihemoglobinei de cal. Linia continuă: 5°C; linia întreruptă: 25°C (adaptată după F. J. Gutter și colab., 1959).

— Formarea de complexe. Acest fenomen intervine între proteine deosebite sau asemănătoare, între proteine și compuși cu greutate moleculară mică și între proteine și săruri. Ultimul tip de complex este greu de decelat la recromatografiere dacă, pentru un motiv oarecare, nu se poate face o dializă exhaustivă a preparatului. În plus, dializa prelungită poate induce ea însăși apariția unor artefacte. Artefactele apar în urma legării proteinelor de substanțe necunoscute (probabil lipide) care se găsesc în membrana de celofan. Astfel, dializa prelungită a mercaptalbuminei umane purificate determină apariția unei eterogenități artificiale (62) (fig. 38).

e) Detectarea impurităților neproteice. În acest scop este necesar ca în fracțiunile colectate să se determine și conținutul în substanțele care pot impurifica preparatul proteic (polizaharide și compuși micromoleculari). Natura chimică a substanțelor neproteice care impurifică preparatul analizat poate fi presupusă ținînd seama de compoziția chimică a sursei din care s-a izolat antigenul.

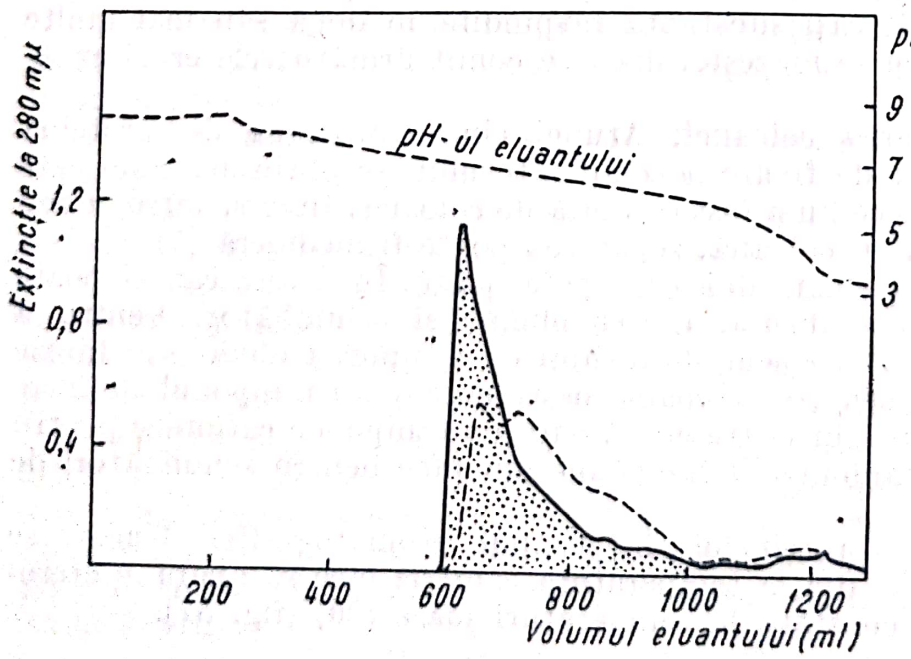


Fig. 38. — Efectul dializei asupra comportării cromatografice a mercaptoalbuminei umane purificate (DEAE-celuloză, eluție în gradient cu tampon TRIS-fosfat, pH 8,5, 0,005—0,5 M, temperatura 5°C). Linia continuă reprezintă curba obținută cu mercaptoalbumina proaspătă; linia întreruptă a fost obținută prin recromatografierea porțiunii hașurate, după o dializă de 54 de ore la 5°C față de tamponul inițial (după H. A. Sober și colab., 1960).

Scanned with OKEN Scanner

4. Testul imunochimic (68) (30)

Omogenitatea imunochimică este unul din criteriile cele mai sensibile pentru testarea purităţii proteinelor şi a polizaharidelor antigenice. Caracteristica fundamentală a testului imunochimic este specificitatea şi marea lui sensibilitate. Testul imunochimic evidenţiază impurităţi chiar în urme, spre deosebire de testele fizico-chimice prezentate înainte, care nu sînt capabile să detecteze impurităţile dacă sînt în cantităţi mai mici de 0,1%. Astfel, testul imunochimic poate pune în evidenţă urmele de proteine sanguine care însoţesc proteinele tisulare obţinute din organe neperfuzate în prealabil (vezi perfuzia organelor). Desigur, impurităţile pot fi evidenţiate numai dacă sînt antigenice; în caz contrar, chiar cantităţi mari de impurităţi trec neobservate.

Controlarea purităţii unui preparat poate fi realizată prin două procedee imunochimice: testul supernatantului, care foloseşte imunoprecipitarea în mediul lichid, şi testul imunodifuziei, care aplică precipitarea în mediu solid (difuzie simplă, difuzie dublă şi imunoelectroforeză).

Testul supernatantului

Dacă un antigen este pur, supernatantul obţinut după îndepărtarea complexului specific antigen-anticorp, alcătuit din acest antigen şi anticorpul omolog, nu poate conţine atît antigenul cît şi anticorpul, ci numai unul din aceşti doi componenţi care rămîne în exces. Dacă însă în supernatant se constată atît prezenţa antigenului cît şi a anticorpului, se poate trage concluzia că antigenul este impur.

Practic se procedează astfel: se distribuie în 5 eprubete un volum fix de antiser şi se adaugă în fiecare eprubetă cantităţi variabile de antigen dizolvate într-un volum fix de soluţie salină fiziologică. Precipitarea se efectuează la 37°C timp de 1 oră, după care se ţin probele 24 de ore la frigider. Conţinutul eprubetelor se centrifughează apoi la rece şi se îndepărtează complexul antigen-anticorp format. Din supernatante se iau părţi alicote şi peste ele se adaugă fie antigenul fie antiserul. Această reacţie de control poate fi efectuată atît în felul descris mai sus, cît şi prin tehnica difuziei simple sau duble în gel.

Dacă se obţin reacţii de precipitare atît între supernatant şi antiser, cît şi între supernatant şi antigen, se consideră dovedită eterogenitatea imunochimică a antigenului testat. Deoarece nu pot coexista în acelaşi supernatant antigenul cu anticorpul corespunzător rezultă că în aceste cazuri în mediu coexistă antigene cu anticorpi necorespunzători. Prezenţa anticorpilor necorespunzători dovedeşte existenţa mai multor antigene în preparatul controlat.

Dacă dimpotrivă, testul pozitiv pentru antigen şi anticorp nu se obţine în acelaşi supernatant, ci supernatantele conţin sau antigenul sau anticorpul sau nici unul dintre ei (zona de echivalenţă a precipitării) este clar că preparatul testat conţine un singur antigen.

Scanned with OKEN Scanner

Testul supernatantului a fost aplicat cu succes la demonstrarea omogenității (49)(28) sau eterogenității (30)(41) unor preparate antigenice.

Rezultatele obținute în testul supernatantului concordă cu cele furnizate de testul imunodifuziei (33)(43).

Testul supernatantului are o serie de limitări. Unele din acestea sînt cauzate de particularitățile metodei, iar altele se datoresc reacției imunologice care stă la baza acestui test. Dacă limitările impuse de particularitățile metodei pot fi înlăturate mai mult sau mai puțin complet aplicînd testul imunodifuziei, limitele impuse de natura reacției care stă la baza metodei îngrădesc în general întreg testul imunochimic.

Astfel, prin testul supernatantului nu se poate stabili numărul antigenelor care impurifică preparatul controlat. În plus, dacă în supernatante sînt prezenți atît antigenul, cît și anticorpul, nu este întotdeauna sigur că preparatul este eterogen. Testul pozitiv pentru antigen și anticorp într-un supernatant dat poate fi determinat și de degradarea parțială din cursul purificării a unui antigen unitar sau datorită existenței unei reacții încrucișate între antigenul testat și antigenele cu care s-au imunizat animalele. În ultimul caz, antiserurile conțin anticorpi care vor putea reacționa încrucișat cu antigenul testat. Dezavantajele enumerate mai sus pot fi în mare măsură eliminate prin aplicarea testelor de imunodifuzie. În schimb, imposibilitatea de a evidenția impuritățile imunologic inerte sau impuritățile față de care nu există anticorpi în antiserul folosit, este o limitare impusă de reacția imunologică folosită în ambele teste și nu poate fi depășită.

Testul imunodifuziei

La testarea purității unui preparat antigenic prin metoda imunodifuziei este de dorit ca experimentatorul să posede un antiser cu anticorpi față de toate impuritățile posibile (antiser polivalent). Acest antiser se obține de obicei prin imunizarea animalelor cu amestecul pur inițial din care trebuie izolat antigenul. Dacă la testarea unui preparat antigenic cu un astfel de antiser polivalent se obține la difuzia simplă sau dublă sau la imunoelectroforeză o singură linie de precipitare, este o dovadă serioasă că antigenul nu conține impurități.

În figura (39) este înfățișat controlul purității unei fracțiuni proteice obținute prin electroforeză preparativă în gel de agaroză, cu ajutorul testului imunoelectroforetic. Deși toate fracțiunile sînt omogene electroforetic, numai o parte din ele prezintă omogenitate imunochimică. Celelalte fracțiuni sînt impurificate cu antigene distincte, dar care se găsesc într-o cantitate care nu poate fi sesizată prin electroforeză (42).

La controlarea purității imunochimice a unui preparat trebuie întotdeauna verificată specificitatea reacției. De aceea, chiar dacă s-a obținut un rezultat negativ pentru impuritatea a cărei prezență era presupusă, este

Scanned with OKEN Scanner

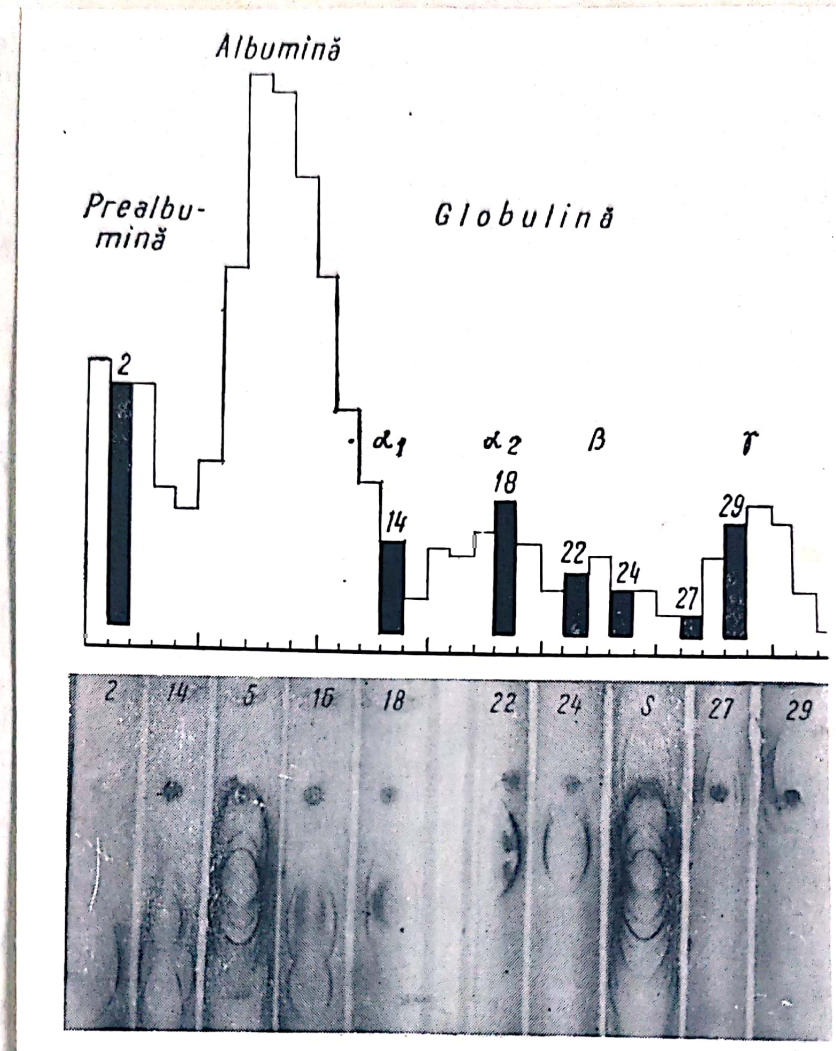


Fig. 39. — Analiza imunoelectroforetică a unor fracţiuni proteice obţinute prin elctroforeză preparativă pe gel de agaroză (după D. M o ţ e t şi colab., 1964).

necesar să se arate printr-un test de imunodifuzie suplimentar că antiserul este capabil să reacţioneze cu impuritatea singură.

Antiserul polivalent folosit la testarea purităţii unui preparat, nu trebuie să fie niciodată înlocuit cu un antiser obţinut prin imunizarea animalelor cu antigenul pur. Folosirea concomitentă a ambelor antiseruri poate fi totuşi oportună în anumite împrejurări. Astfel, imunizînd animale cu un antigen presupus pur (dă numai o singură linie de precipitare cu antiserul polivalent) se poate obţine un antiser care, pus în contact cu antigenul „pur", să dea două sau mai multe linii de precipitare. În aceste cazuri, din antiserul polivalent lipsesc anticorpii capabili să reacţioneze cu impurităţile sau se găsesc în cantitate prea mică pentru a da o reacţie vizibilă. O astfel de situaţie intervine dacă impurităţile care însoţesc pre-

paratul purificat se găsesc în preparatul brut în cantităţi prea mici pentru a putea stimula formarea anticorpilor decelabili în antiserul polivalent. Dimpotrivă, injectarea preparatului „pur", care conţine cantităţi mai mari de impurităţi decît preparatul brut, poate determina formarea anticorpilor faţă de aceste impurităţi, mai ales dacă se administrează în amestec cu adjuvanţi. Deci, imunizarea este o cale foarte eficientă pentru decelarea impurităţilor, bineînţeles cu condiţia ca organismul să producă anticorpi faţă de aceste impurităţi.

Din cele înfăţişate mai sus rezultă că testarea purităţii unui antigen, atît cu un antiser preparat faţă de produsul brut iniţial, cît şi faţă de produsul „pur", creşte probabilitatea ca omogenitatea sau eterogenitatea notată să corespundă unei realităţi chimice.

Antiserurile folosite provin de obicei sau de la iepure sau de la cal. La testarea purităţii este bine să se folosească seruri puternice (cu titru mare), obţinute de la două sau chiar mai multe specii, deoarece capacitatea de a forma anticorpi precipitanţi depinde de specia folosită.

Serurile hiperimune provenite de la mai multe animale aparţinînd aceleiaşi specii nu trebuie amestecate, deoarece conţinutul cantitativ şi calitativ al antiserurilor nu este identic. Pot exista antiseruri care să posede anticorpi faţă de anumite impurităţi, după cum pot exista antiseruri în care lipsesc sau se găsesc în cantităţi mici atît anticorpii faţă de impurităţi, cît şi cei faţă de antigenul principal. De aceea, amestecînd antiserurile, experimentatorul îşi micşorează şansele de a putea evidenţia impurităţile aflate în cantităţi mici sau dotate cu antigenicitate slabă. Nu trebuie uitat că antigenicitatea diferitelor substanţe nu este identică şi că cantitatea anticorpilor produşi nu este direct proporţională cu cantitatea antigenului injectat.

Impurităţile aflate în cantităţi foarte mici, deşi reacţionează cu anticorpii corespunzători, pot forma un complex imun care nu este vizibil în gelul de agar. În aceste cazuri se poate stimula agregarea impurităţilor cu anticorpii corespunzători, scufundînd gelul cîteva minute în soluţia unei sări de cadmiu sau de nichel 0,01 g% (12). Se creşte astfel de cîteva ori capacitatea antiserului de a forma precipitate vizibile.

Eterogenitatea imunochimică manifestată prin apariţia a două sau mai multe linii de precipitare la testele de imunodifuziune este uneori aparentă, fiind cauzată de apariţia artefactelor. Detectarea artefactelor se face mai uşor prin tehnica imunoelectroforetică decît prin cea de difuziune simplă sau dublă. În majoritatea cazurilor, artefactele sînt cauzate fie de un exces de antigen, fie de anticorp. Dacă se modifică raportul dintre aceşti doi componenţi sau dacă se foloseşte alt antiser şi se constată menţinerea doar a unei singure linii de precipitare, este o dovadă că celelalte linii erau artefacte cauzate de condiţiile experienţei.

Invers, omogenitatea imunochimică nu reflectă întotdeauna şi omogenitatea chimică a antigenului analizat. Este suficient să arătăm că testul imunochimic nu poate diferenţia ovalbumina de derivaţii ei fosforilaţi (11), ribonucleaza A de ribonucleaza B (6), β-lactoglobulina A de B (19). Limitarea testului poate fi cauzată uneori şi de tehnica

aplicată. Astfel, ribonucleazele A şi B pot fi diferenţiate prin compararea curbelor de precipitare (9). În alte cazuri, deşi se obţine o singură linie de precipitare, forma şi dimensiunile ei pot indica experimentatorului o eterogenitate reală. Este cazul γ-globulinei.

Aceste date arată că testul imunochimic nu se poate aplica pentru controlul separării antigenelor care posedă proprietăţi imunochimice asemănătoare.

II. MODIFICAREA ANTIGENELOR ÎN TIMPUL PRELUCRĂRII (52)

Dacă în cursul preparării antigenelor proteice se folosesc condiţii experimentale neadecvate, se poate produce modificarea structurii lor native. Gradul de transformare a structurii native poate varia în raport cu condiţiile de preparare folosite, de la modificări structurale neînsemnate pînă la modificarea completă a aşezării catenelor polipeptidice în moleculă (denaturare). Denaturarea presupune schimbarea configuraţiei spaţiale specifice a proteinei native. Dacă modificările structurale neînsemnate pot să nu afecteze structura antigenică nativă a proteinelor, în schimb denaturarea, prin schimbarea conformaţiei spaţiale, va distruge structura antigenică, provocînd apariţia unei antigenicităţi noi, specifice proteinei denaturate. În urma denaturării se modifică atît antigenicitatea, cît şi specificitatea moleculei proteice. Astfel, ovalbumina denaturată reacţionează foarte slab cu anticorpul specific proteinei native, cantitatea de complex antigen-anticorp formată fiind numai de 1-2% din cantitatea care se formează cu ovalbumina nativă (39). De aceea, operaţiile care pot provoca modificarea structurii antigenice trebuie folosite cu prudenţă; ele pot constitui o sursă permanentă de eroare la prepararea antigenelor şi la obţinerea antiserurilor specifice.

Denaturarea proteinelor presupune dezorganizarea structurii terţiare şi secundare[1] a moleculei, datorită ruperii legăturii dintre catenele polipeptidice şi deplierii acestor catene. În funcţie de caracterul acţiunii agentului denaturant, catenele polipeptidice devenite libere pot rămîne desfăşurate sau se pot replia din nou, cu formarea unei structuri specifice foarte apropiate sau chiar identice cu cea nativă sau pot forma o structură nouă diferită de cea nativă.

---

[1] Structura proteinelor poate fi examinată la trei nivele diferite, denumite structura primară, secundară şi terţiară sau de ordinul I, II şi III (37). Structura primară este alcătuită de secvenţa reziduurilor de aminoacizi în catenele polipeptidice şi este asigurată de legăturile covalente dintre aceste reziduuri. Structura secundară constă în configuraţia catenelor polipeptidice — felul în care sînt pliate catenele — iar menţinerea ei este asigurată prin legături de hidrogen, legături saline, legături hidrofobe şi forţe Van der Waals. Structura terţiară este reprezentată de felul în care sînt aşezate în spaţiu catenele polipeptidice şi de aranjarea lor compactă în molecula proteică. Structura secundară este în interdependenţă cu structura terţiară, ambele alcătuind macrostructura proteinei.

Scanned with OKEN Scanner

Capacitatea proteinelor de a-şi reface structura nativă („renaturare") se păstrează numai în urma unei acţiuni denaturante moderate, limitată în intensitate şi durată. Acest fapt nu invită totuşi la micşorarea exigenţelor experimentale în timpul prelucrării antigenelor, deoarece la nivelul cunoştinţelor actuale nu există certitudinea că proteina denaturată reversibil revine *exact* la structura nativă iniţială. De altfel, o revenire în cele mai mici amănunte la forma nativă este puţin probabilă şi din cauză că într-o macromoleculă proteică există un număr foarte mare de legături echivalente din punct de vedere energetic, astfel că revenirea catenelor depliate se poate face în mai multe variante. De aceea, între forma denaturată şi cea nativă pot exista o serie de forme intermediare, de tranziţie, a căror structură reprezintă variante intermediare între cele două structuri limită.

Proteina nativă şi formele intermediare rezultate în urma denaturării pot să aibă proprietăţi fizico-chimice şi imunochimice diferite. În aceste cazuri, experimentatorul care a produs accidental o denaturare poate greşi de două ori : contestă omogenitatea preparatului şi îi conferă o structură antigenică pe care acesta nu o are în stare nativă. Dacă tehnica de preparare a unui antigen nu este riguros respectată, se obţin antigene care diferă de la şarjă la şarjă. Presupunînd că imunizarea animalelor s-a făcut cu şarja care conţine antigenul modificat, iar analiza imunochimică cu şarja care conţine antigenul nativ sau invers, rezultatele obţinute vor fi greşite şi uneori experimentatorul nu poate să-şi dea seama de acest lucru.

Aplicînd cele mai „blînde" metode de izolare, se pot obţine proteine care îşi păstrează structura antigenică nativă. Desigur, în urma extracţiei se desfac asociaţiile labile dintre proteine şi compuşii neproteici existente în celule, dar aceste schimbări pot avea loc fără modificarea structurii antigenice a proteinei cercetate. De asemenea, în procesul obţinerii preparatului se pot scinda unele grupe amidice nestabile şi, prin urmare, pot apare modificări structurale. Dar o astfel de scindare nu este caracteristică prelucrării, deoarece ea poate avea loc şi în organism (32).

Faptul că proteinele izolate din celulă îşi păstrează structura antigenică nativă nu înseamnă că există o identitate structurală deplină între proteinele obţinute printr-un procedeu corect de preparare şi proteina nativă. Moleculele proteice au porţiuni care sînt legate prin forţe slabe şi care au tendinţa de a trece de la o configuraţie la alta. Astfel de transformări locale pot fi provocate în cursul preparării proteinelor şi în prezent nu ştim cum se repercutează ele asupra antigenicităţii şi specificităţii lor.

Dacă în cursul preparării antigenelor, în ciuda precauţiilor luate, a intervenit o denaturare accidentală, experimentatorul o poate sesiza urmărind una din proprietăţile fizico-chimice şi biologice care semnalizează denaturarea (46) :

a) Scăderea solubilităţii proteinei. Aceasta se observă uşor în apropierea pH-ului izoelectric la care proteinele denaturate precipită. Micşorarea solubilităţii este determinată de apariţia grupărilor apolare hidrofobe la suprafaţa moleculei, în urma deplierii catenelor.

b) Apariţia unor grupări chimice. În urma desfăşurării catenelor, grupări active care în proteina nativă erau inaccesibile sau parţial accesi-

Scanned with OKEN Scanner

bile pentru reactiv, devin accesibile. De aceea, proteinele denaturate dau reacţii de culoare mai intense şi uneori prezintă reacţii caracteristice pentru anumite grupări funcţionale inexistente în proteina nativă. Astfel, apariţia grupărilor -SH, capabile de a reacţiona cu nitroprusiatul, indică denaturarea proteinei respective.

c) Pierderea capacităţii de cristalizare, la proteinele cristalizabile.

d) Modificarea proprietăţilor optice (activitatea optică, birefringenţa şi absorbţia în UV). Schimbarea levorotaţiei indică modificarea legăturilor din jurul carbonilor asimetrici, birefringenţa creşte datorită restructurării catenelor polipeptidice, iar spectrul de absorbţie în UV se schimbă datorită apariţiei grupărilor fenolice mascate în proteina nativă.

e) Modificarea viscozităţii şi presiunii osmotice. Proteinele denaturate au în general o viscozitate mai mare decît cele native, datorită modificării formei moleculare şi a hidratării lor. Presiunea osmotică variază numai dacă denaturarea este însoţită de formarea agregatelor proteice mari sau de scindarea în fragmente mai mici.

f) Modificarea proprietăţilor electroforetice. În urma denaturării se schimbă punctul izoelectric, viteza de migrare şi uneori omogenitatea proteinei.

g) Schimbarea capacităţii de a adsorbi molecule mici (coloranţi, ioni, lipide etc.). Adsorbţia moleculelor mici depinde de existenţa zonelor corespunzătoare de adsorbţie la suprafaţa moleculei proteice. Unele proteine pierd prin denaturare capacitatea de a lega coloranţii acizi, iar altele, dimpotrivă, leagă coloranţii mai puternic decît forma nativă (ovalbumina, roşu de Congo).

h) Creşterea sensibilităţii la acţiunea enzimelor. Creşterea sensibilităţii la tripsină este cauzată de faptul că legăturile scindabile devin accesibile enzimei. Este un criteriu foarte sensibil de apreciere al gradului de denaturare a proteinelor.

i) Pierderea specificităţii biologice. Prin denaturare, enzimele pierd capacitatea de a acţiona asupra substratului, hormonii proteici îşi pierd activitatea hormonală, unele toxine îşi pierd toxicitatea, iar anticorpii nu mai pot reacţiona cu antigenele corespunzătoare.

Acţiunile denaturante care pot interveni în timpul izolării, purificării şi păstrării antigenelor sînt determinate de specificul tehnicilor aplicate şi de natura chimică a proteinei preparate. Măsurile obişnuite de precauţie care trebuie luate, indiferent de tehnicile folosite şi de natura chimică a proteinei, implică controlul temperaturii şi al pH-ului, selecţionarea substanţelor chimice întrebuinţate la preparare, evitarea manipulărilor cu efect denaturant, blocarea enzimelor proteolitice şi asigurarea sterilităţii preparatelor.

1. Controlul temperaturii

Acţiunea denaturantă a temperaturii se manifestă în anumite limite, destul de largi, care depind direct de proprietăţile proteinelor respective. În general, proteinele se denaturează la temperaturi mai mari

Scanned with OKEN Scanner

de 45—50°C, însă există şi proteine care rezistă cîteva minute chiar la fierbere (ribonucleaza, lizozim etc.). Temperaturile ridicate trebuie evitate în cursul preparării antigenelor termolabile. De altfel, majoritatea operaţiilor la care este supusă o proteină în cursul preparării ei se efectuează *obligatoriu* la temperatura frigiderului (+ 4°C), de aceea, posibilitatea denaturărilor prin temperaturi ridicate este practic exclusă.

Mai importantă este controlarea influenţei pe care o exercită temperaturile joase asupra proteinelor, deoarece în timpul preparării lor, la diferite operaţii se folosesc temperaturi scăzute, care pot coborî pînă la —70°C. Mai mult decît atît, alternarea temperaturilor scăzute cu cele ale camerei (îngheţare-dezgheţare) se practică destul de curent în cursul preparării unor antigene. Este unanim admis că temperaturile scăzute nu provoacă denaturarea majorităţii proteinelor. Există totuşi proteine care se denaturează total sau numai parţial, prin liofilizare sau prin îngheţare. Astfel sînt: β-lipoproteina (66), carboxipeptidaza (7), actomiozina (23), ovalbumina (22), ceruloplasmina (13), unii anticorpi (22) etc. Nu se poate preciza dacă denaturarea este produsă de temperatura scăzută (prin modificarea hidratării proteinelor) sau datorită spumării şi uscării care intervine uneori în cursul liofilizării. Astfel, ovalbumina liofilizată în condiţii controlate nu se denaturează (69).

Alterarea structurii proteinelor se poate produce nu numai în cursul liofilizării, ci şi în timpul manipulărilor curente, efectuate la temperaturi mai apropiate de 0°C.

Astfel, dehidrogenaza lactică suferă importante modificări în structură (distrugerea unor izozime) şi în activitate prin păstrare la —20°C (71). De aceea, la analiza preparatelor enzimatice obţinute prin procedeul curent de îngheţare-dezgheţare a suspensiilor de celule, se obţin rezultate greşite. Mai mult, este preferabil ca preparatele de dehidrogenază lactică să se păstreze la temperatura camerei şi nu la temperatura frigiderului. Inhibarea enzimei prin menţinere la temperatură scăzută poate fi eliminată, adăugînd coenzimă (NAD) sau glutation redus.

Rezultă că menţinerea preparatelor proteice la temperaturi scăzute nu exclude posibilitatea modificărilor de structură, de aceea, în unele cazuri se impune şi controlarea efectului pe care îl exercită temperaturile scăzute asupra proteinei cercetate.

2. Controlul pH-ului

Stabilirea limitelor de pH în care o proteină dată este stabilă se poate face numai după purificarea ei. De aceea, în cazul prelucrării antigenelor a căror comportare în funcţie de pH-ul mediului nu este cunoscută, trebuie respectată indicaţia generală de a evita extremităţile acide şi alcaline ale pH-ului. Aceasta cu atît mai mult, cu cît multe proteine sînt stabile numai într-un interval mic de pH şi se denaturează rapid dacă soluţia devine acidă sau bazică. Modificarea nedenaturantă a structurii proteinelor este posibilă chiar la variaţii mici de pH. Astfel, s-a arătat (64) că

Scanned with OKEN Scanner

β-lactoglobulina își modifică rotația optică și viteza de sedimentare prin simpla trecere dintr-un mediu neutru în altul slab alcalin. Modificările se pot explica prin acțiunea pH-ului asupra grupărilor ionizate ; se schimbă starea acestor grupări, ceea ce determină indirect o restructurare a părților hidrofobe ale moleculei și deci modificarea configurației ei.

pH-ul maximei stabilități a majorității proteinelor este în jurul neutralității și nu în jurul pH-ului izoelectric. Astfel, albumina serică are maximul de stabilitate în jur de 6,8 deși pH-ul izoelectric este 4,6. Trebuie avut în vedere și excepțiile. Pepsina este mai stabilă la pH 5 decît la pH-ul neutralității la care, de altfel, se distruge.

Acțiunea denaturantă a pH-urilor extreme poate fi explicată prin acțiunea acizilor și a bazelor asupra grupărilor ionice ale proteinelor. Acizii minerali transformă gruparea electronegativă $—COO^-$ în —COOH și astfel se rupe legătura $—COO^- \ . \ . \ . \ H_3{}^+N—$ și catena polipeptidică se desfășoară. În mod analog se pierde sarcina pozitivă prin acțiunea bazelor.

3. Selecționarea substanțelor chimice întrebuințate la preparare

Numeroase substanțe chimice folosite la fracționarea proteinelor pot cauza, în condiții experimentale neadecvate, denaturarea acestora. Astfel, aplicarea fracționării cu solvenți organici (metanol, etanol, acetonă etc.), cu ionii metalelor grele (zinc, plumb, mercur etc.) sau folosirea în diferite împrejurări a detergenților ionici și a amidelor (uree, guanidină) pot determina modificări profunde ale structurii antigenice. Pentru a elimina aceste posibilități trebuie respectate strict indicațiile privind concentrația agentului de fracționare și temperatura. Pe cît este posibil, experimentatorul trebuie să selecționeze, în vederea purificării, substanțele chimice cele mai inofensive și să folosească în cursul operațiilor temperaturile scăzute.

4. Evitarea manipulărilor cu efect denaturant

Proteinele se denaturează la agitare puternică sau prin turnare în straturi subțiri. Cunoscînd aceste lucruri, trebuie să se evite formarea spumei prin amestecare prea puternică a soluțiilor proteice, prin trecerea bruscă a unei soluții dintr-un vas în altul etc. Spumarea soluțiilor proteice, mai ales a celor diluate, cauzează întotdeauna o denaturare considerabilă.

Proteinele native, uscate (liofilizate), se denaturează și prin mojarare, procedeu folosit uneori la dizolvarea lor. Mojararea cauzează deformări mecanice sau ruperea catenelor polipeptidice.

La adiționarea reactivilor (acizi, baze, săruri, solvenți etc.) este necesar să se evite formarea exceselor locale care duc la denaturare. De aceea, adăugarea reactivilor se face întotdeauna picătură cu picătură, sub agitare.

Scanned with OKEN Scanner

Folosirea ultrasunetelor pentru ruperea structurii celulare poate cauza denaturarea proteinelor cu dimensiuni moleculare mari (22). De aceea, trebuie luate anumite precauţii atît pentru limitarea frecvenţei generatorilor (maximum 9 000 Hz), cît şi pentru eliminarea efectului termic.

5. Blocarea enzimelor proteolitice

În timpul operaţiilor de izolare este posibil ca în extracte să coexiste atît antigenul proteic cercetat, cît şi enzimele proteolitice capabile să acţioneze asupra acestuia. Este cazul extractelor de pancreas, în care enzimele proteolitice provoacă distrugerea insulinei. În procesul de purificare enzima poate fi îndepărtată sau, dimpotrivă, se poate concentra alături de fracţiunea izolată, provocîndu-i alterări grave.

Efectuarea manipulărilor la temperaturi scăzute este o precauţie generală, care foloseşte şi în aceste cazuri, deoarece scade considerabil activitatea enzimelor. Ţinute un timp îndelungat în contact cu antigenul, enzimele pot provoca alterări chiar la temperaturi scăzute, de aceea este recomandabilă introducerea în mediu a unor substanţe care blochează activitatea lor specifică. Dacă enzima nu este activă într-o zonă de pH în care antigenul este stabil, se poate realiza şi pe acestă cale blocarea acţiunii ei. Alegerea inhibitorului se face în funcţie de enzima proteolitică care impurifică preparatul şi avînd grijă ca el să nu producă alterarea antigenului. Se pot folosi acidul ε-aminocapronic (3 g%) şi bromatul de potasiu (0,1 g%).

În unele cazuri este necesară nu numai blocarea enzimelor proteolitice, ci şi a altor enzime care pot acţiona indirect asupra structurii native a proteinei, distrugînd componentele neproteice legate de proteină (lipide în lipoproteine, glucide în glucoproteine etc.).

6. Asigurarea sterilităţii preparatului

Microorgansimele prezente în soluţiile proteice modifică structura, schimbă activitatea biologică şi impurifică soluţia cu componente proteice în plus. Astfel, infectarea soluţiilor de ovalbumină cu *Bacillus subtilis* determină formarea unui component proteic nou, plakalbumina, înzestrat cu caractere imunochimice distincte. Plakalbumina rezultă în urma scindării unei catene de 7 aminoacizi din molecula de ovalbumină nativă, provocată de subtilizină, enzimă proteolitică elaborată de microorganism în mediu (47).

De obicei, în cursul operaţiilor de izolare şi de purificare nu se iau măsuri de precauţie pentru asigurarea sterilităţii, deoarece se lucrează la temperaturi scăzute la care microorganismele nu se dezvoltă, iar durata operaţiilor este limitată. În schimb, în timpul păstrării trebuie asigurată sterilitatea preparatelor, chiar dacă ele se păstrează la temperatura frigiderului. În acest scop se poate efectua fie filtrarea peste filtre Seitz, fie

Scanned with OKEN Scanner

adăugarea unor substanţe bactericide (mertiolat de sodiu, azidă de sodiu) dacă preparatul se găseşte în stare lichidă. Dacă preparatul se păstrează sub formă solidă, nu este necesară asigurarea sterilităţii decît în împrejurări speciale.

Bibliografie

1. Amos D. B., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, **97**, 69.
2. Aoki K. a. Foster J. E., J. Am. Chem. Soc., 1956, **78**, 3538.
3. Ascahppenburg R. a. Drewry J., Nature, 1957, **180**, 376.
4. Bier M., Terminiello L., Duke J. A., Gibbs R. A. a Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., 1953, **47**, 465.
5. Boman H. G. a. Westlund L. E., Arch. Biochem. Biphys., 1957, **70**, 572.
6. Brown R. K., Delaney R., Levine L. a. Vonakis H., J. Biol. Chem. 1959, **234**, 2043.
7. Bull H. B., J. Am. Chem. Soc., 1944, **66**, 1 499.
8. Butler A. M. a. Montgomery H., J. Biol. Chem., 1933, **99**, 173.
9. Carter B. G., Cinader B. a. Ross C. A., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1961, **94**, 1040.
10. Cinader B., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, **103**, 495.
11. Colvin J. R., Smith D. B. a. Cook W. H., Chem. Reviews, 1954, **54**, 687.
12. Crowle A., *Immunodiffusion*, Acad. Press, New York, 1961.
13. Curzon G. a. Vallet L., Biochem. J., 1960, **74**, 279.
14. Derrien Y., Biochim. Biophys. Acta, 1952, **8**, 631.
15. Falconer J. S. a. Taylor D. B., Biochem. J., 1946, **40**, 835.
16. Fredericq E. a. Deutsch H. F., J. Biol. Chem., 1949, **181**, 499.
17. Gheţie V. şi Moţet-Grigoraş D., St. şi cerc. biochim., 1962, **5**, 409.
18. Gordon A. H., Rell B., Sebesta K., Knessel O. a. Sorm E., Coll. Czech. Chem. Communs., 1950, **15**, 1.
19. Gough P. a. Jenness R., J. Immunol., 1962, **89**, 511.
20. Grabar P. a. Williams C., Biochim. Biophys. Acta, 1955, **17**, 67.
21. Gutter F. J., Peterson E. A. a. Sober H. A., Arch. Biochem. Biophys., 1959, **80**, 353.
22. Haurowitz F., *Chemistry and biology of proteins*, Acad. Press, New York, 1950.
23. Henoh M. A., Pinaev G. P. i Kovalova E. A., Sb. rabot. Instit. Ţitol., AN SSSR, 1963, **4**, 6.
24. Herriott R. M., Chem. Reviews, 1942, **30**, 413.
25. — în Colowick S. P. a. Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 1957, **IV**, 212.
26. Hirs C.H.W., Moore S. a. Stein W. H., J. Biol. Chem., 1953, **200**, 493.
27. Hoch H., Nature, 1950, **165**, 278.
28. Hornus G. J. P. et Grabar P., Ann. Inst. Pasteur, 1941, **66**, 136.
29. Kabat E. A., J. Immunol., 1943, **47**, 513.
30. Kabat E. A., Kaiser H. a. Sikorski H., J. Exp. Med., 1944, **80**, 299.
31. Kaplan N. D. a. White S., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, **103**, 835.
32. Kauzmann W., Adv. Prot. Chem., 1959, **14**, 1.
33. Kendall F. E., J. Clin. Investig., 1937, **16**, 921.
34. Kohn J., Clin. Chim. Acta, 1957, **2**, 297.
35. Kunitz M., J. Gen. Physiol., 1938—1939, **22**, 207.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL IV-LEA. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ANTIGENELOR

În cursul preparării antigenelor, necesitatea determinării lor cantitative intervine aproape la fiecare etapă. Astfel se urmăreşte :

a) Cantitatea de antigen izolată din ţesut raportată la greutatea umedă sau uscată a ţesutului sau la antigenele totale prezente în ţesut.

b) Variaţia cantităţii de antigene în cursul purificării, prin care se controlează pierderile accidentale care pot interveni în timpul preparării.

c) Stabilirea activităţii specifice a antigenelor dotate cu activitate biologică (enzime, hormoni, anticorpi etc.). Cum activitatea specifică reprezintă activitatea enzimatică raportată la cantitatea de proteină prezentă în amestec, rezultă clar necesitatea determinării concentraţiei proteice.

d) Determinarea concentraţiei antigenului în probele analizate prin metode fizico-chimice. Acesta este mijlocul de exprimare al rezultatelor la stabilirea curbelor de eluţie cromatografică, curbelor de solubilitate, curbelor de electroforeză preparativă etc.

e) Determinarea antigenelor şi anticorpilor în precipitatele imune. Se măsoară prin aceasta cantitatea unui antigen dat într-un amestec complex de antigene, ca şi cantitatea de anticorpi prezenţi într-un antiser.

Determinarea cantitativă a antigenelor se realizează prin metode alese în concordanţă cu natura proteică sau polizaharidică a antigenelor. Atît proteinele, cît şi polizaharidele pot fi dozate însă şi printr-o metodă unică, care foloseşte reacţia imună cantitativă de precipitare a antigenelor. Această metodă imunochimică este net superioară metodelor chimice şi fizico-chimice de determinare a antigenelor. Ea are o înaltă specificitate şi de aceea permite determinarea unui component într-un amestec complex, fără fracţionarea acestuia. Astfel, o proteină dată poate fi dozată cu o precizie satisfăcătoare într-un amestec care conţine şi alte proteine, performanţă ce nu poate fi realizată de nici o altă metodă. În plus, se consumă cantităţi mici de material.

Metoda imunochimică serveşte atît la determinarea cantitativă a antigenelor, cît şi a anticorpilor, folosind reacţia imună de precipitare combinată cu una din metodele chimice de dozare a proteinelor. Tehnica experimentală este detaliată în capitolul IX.

Scanned with OKEN Scanner

I. ANTIGENE PROTEICE (26) (29)

Metodele de dozare se bazează pe determinarea unui constituent al moleculei proteice. Astfel se poate măsura cantitatea de azot din moleculă (metoda Kjeldahl), numărul de legături peptidice (metoda biuretului), cantitatea de tirozină şi triptofan (metoda absorbţiei în UV) etc.

Deoarece constituenţii sau grupările care se dozează nu se găsesc în cantităţi egale în toate proteinele, este evident că la analiza unui amestec de proteine cu o compoziţie necunoscută, concentraţia lor va fi măsurată cu o oarecare aproximaţie.

Pentru măsurători exacte, experimentatorul trebuie să cunoască conţinutul în azot al proteinei studiate sau să-şi construiască o curbă etalon, folosind în acest scop tocmai proteina care urmează să fie dozată. Pentru dozarea proteinelor totale dintr-un amestec nu este recomandabilă folosirea curbelor etalon construite cu proteine pure. Însă experimentatorul este obligat deseori să recurgă la această modalitate, de aceea şi valorile obţinute sînt aproximative.

În toate tipurile de proteine, distribuţia cea mai constantă o are gruparea peptidică. Corespunzător acestei situaţii, reacţia biuretului este dată cu o intensitate asemănătoare de majoritatea proteinelor. Diferenţele între coeficienţii de extincţie ai diferitelor proteine nu trec de 20%, valoare mică în comparaţie cu variaţiile mari înregistrate la celelalte metode bazate pe determinarea tirozinei şi triptofanului (metoda adsorbţiei în UV şi metoda Lowry). Chiar compoziţia procentuală în azot a proteinelor suferă fluctuaţii mari, valorile fiind cuprinse între 14 şi 19%.

La alegerea metodei de dozare, experimentatorul trebuie să ţină seamă de cele înfăţişate mai sus. În plus, în raport cu scopurile urmărite, trebuie avut în vedere că metodele înfăţişate în acest paragraf diferă prin sensibilitate, specificitate şi precizie.

Sensibilitatea cea mai mare o au metodele Kjeldahl şi Lowry, urmate de metoda absorbţiei în UV şi metoda biuretului. Metoda Lowry este de 10-20 de ori mai sensibilă decît măsurarea absorbţiei în UV (280 mμ) şi de 100 de ori mai sensibilă decît metoda biuretului.

Specificitatea cea mai înaltă o posedă metoda biuretului; foarte puţine substanţe neproteice sînt capabile să reacţioneze în acest fel. Metoda Lowry şi metoda Kjeldahl sînt mai puţin specifice. Specificitatea mai scăzută a metodei Kjeldahl este determinată de dificultatea de a separa complet fracţiunile proteice de celelalte substanţe conţinînd azot. Cea mai scăzută specificitate o are măsurarea absorbţiei în UV, deoarece o serie de substanţe neproteice au capacitatea de a absorbi lumina la 280 mμ, stînjenind determinările.

Precizia cu care se obţin rezultate variază, de asemenea, de la metodă la metodă. O precizie remarcabilă au metoda Kjeldahl şi metoda absorbţiei în UV. Celelalte metode, mai puţin precise, pot fi folosite cu succes în scopurile analitice curente. Metoda Kjeldahl are o precizie de ±0,2%, în timp ce la celelalte metode precizia variază între 2 şi 10%.

Scanned with OKEN Scanner

În cursul preparării antigenelor proteice este nevoie de multe ori de o metodă rapidă, cu o precizie moderată. Sub acest aspect, cea mai rapidă este metoda absorbției în UV care nu necesită nici un fel de operații preliminare. Celelalte metode colorimetrice necesită manipulări suplimentare pentru producerea reacției de culoare, iar metoda Kjeldahl, cu operațiile de mineralizare și de determinare a amoniacului, rămîne o tehnică laborioasă. Mai mult decît atît, metoda absorbției în UV este singura metodă care permite folosirea și în alte scopuri a probelor analizate, deoarece nu modifică starea proteinelor. Acest fapt se exploatează mai ales la cromatografia preparativă pe coloană, cînd în fracțiunile colectate se poate determina concentrația proteică fără a renunța la partea alicotă destinată dozării.

Uneori antigenele se găsesc dizolvate în volume atît de mici de solvent, încît aplicarea metodelor de dozare înseamnă consumarea întregului volum de substanță. În aceste cazuri este preferabilă aplicarea unei micrometode care să nu consume mai mult de 10—20 μl de soluție proteică. Din acest motiv, s-a considerat că prezentarea micrometodelor bazate pe legarea coloranților de către proteine poate fi utilă pentru cazuri speciale. Metodele sînt sensibile, iar specificitatea, precizia și reproductibilitatea lor sînt satisfăcătoare.

1. Metoda Kjeldahl (27)

Principiul. Analiza azotului în amestecurile de proteine și, în general, în toate materialele biologice, se face în trei etape distincte :

a) Mineralizarea — convertirea azotului organic în sulfat de amoniu : N-organic $\rightarrow (NH_4)_2SO_4 + CO_2 + H_2O$

b) Eliberarea amoniacului prin descompunerea sulfatului de amoniu : $(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$

c) Dozarea amoniacului prin mai multe procedee :

— Distilare cu ajutorul aparatului Parnas—Wagner.

— Distilare izotermă în vase de microdifuziune.

— Nesslerizare sau reacția cu ninhidrină.

Se acceptă, în general, că un amestec de proteine conține în medie 16% azot. De aceea, conținutul în proteine al unei probe se obține prin înmulțirea azotului determinat cu factorul 6,25 (100/16). Dacă în amestecurile proteice se găsesc și alte substanțe cu azot, dozarea azotului și înmulțirea valorii obținute cu 6,25 conduce întotdeauna la date inexacte (mai mari). În aceste cazuri, proteinele trebuie separate de substanțele azotate neproteice prin deproteinizare cu acid tricloracetic 10-20% sau acid fosfowolframic 10%. Efectuînd două dozări de azot, în amestecul proteic inițial și în supernatantul deproteinizat se poate calcula cantitatea reală de azot proteic după formula :

$$N_p = N_t - nN_s ,$$

unde N_t = azotul determinat în amestecul proteic inițial ; N_s = azotul din supernatantul deproteinizat ; n = de cîte ori s-a diluat amestecul inițial prin adăugarea deproteinizantului. De exemplu, efectuînd deproteinizarea în raportul 1 volum de soluție proteică/2 volume de acid triclora cetic 10%, n = 3.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. Acid sulfuric concentrat saturat cu sulfat de cupru. La 1 kg de acid sulfuric p.a. liber de azot, se adaugă în porţiuni mici, sub agitare, 10 ml soluţie apoasă saturată de sulfat de cupru. După depunerea excesului de sulfat de cupru anhidru, reactivul este gata pentru analiză.

— Sulfat de potasiu anhidru p.a. liber de azot.

— Soluţie saturată de hidroxid de sodiu. Se dizolvă 100 g NaOH p.a. în 100 ml de apă distilată. Se agită pînă la dizolvare, apoi vasul se introduce într-o baie de apă încălzită aproape de fierbere şi se lasă 5-6 ore. În acest timp se depune carbonatul de sodiu. Se lasă să se răcească la temperatura camerei, se decantează supernatantul limpede şi se păstrează în vase perfect închise.

— Acid boric 2 g%. Se foloseşte un produs p.a. Acidul boric chimic pur nu permite un viraj net al indicatorilor, deoarece are o slabă capacitate de tamponare.

Amestec indicator. Se amestecă volume egale din soluţiile alcoolice de roşu de metil 0,2 g% şi albastru de metilen 0,1 g%. Virajul are loc între pH-ul 4,9 şi 5,3. Peste acest pH soluţia este verde-cenuşie, iar sub el culoarea virează în roz-cenuşie.

— Acid clorhidric titrat N/100.

Mineralizarea. Descompunerea substanţei organice se realizează prin fierbere cu acid sulfuric concentrat în prezenţa unui catalizator ($CuSO_4$) şi a unei substanţe adjuvante care asigură ridicarea punctului de fierbere (K_2SO_4).

Se introduce proba exact măsurată într-un vas Kjeldahl de 50-100 ml. Se adaugă 2 ml de acid sulfuric concentrat, saturat în sulfat de cupru şi aproximativ 1g de sulfat de potasiu. Cantitatea de materii organice ce urmează să fie distrusă nu trebuie să se găsească în amestecul de kjeldahlizare în cantitate mai mare de 100 mg pentru 2 ml de acid sulfuric concentrat. Se introduc apoi baloanele într-un aparat de mineralizare în care se asigură o încălzire constantă care ridică temperatura de mineralizare la 350—400°C (fig. 40). Trebuie supravegheat ca flacăra să nu depăşească nivelul lichidului din baloane, deoarece se pot produce pierderi de azot. După evaporarea apei, apare un fum alb de SO_3 şi soluţia din balon se limpezeşte şi se decolorează. Fierberea se continuă încă o jumătate de oră după ce soluţia a adevenit limpede şi incoloră. În medie, o mineralizare durează 3 ore. Se lasă apoi baloanele să se răcească la temperatura camerei.

Durata mineralizării poate fi scurtată considerabil, adăugînd amestecului perhidrol (H_2O_2). După ce apare fumul alb de SO_3, se adaugă 3-4 picături de perhidrol, limpezirea şi decolorarea amestecului producîndu-se în cîteva minute.

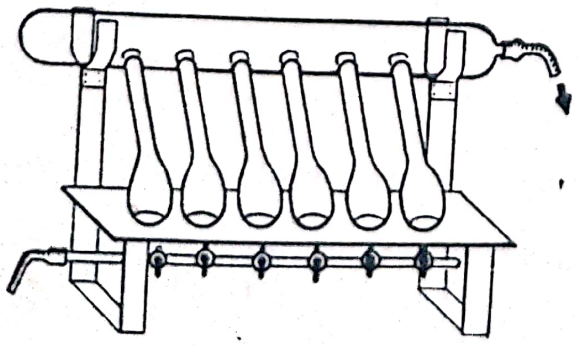


Fig. 40. — Instalaţie pentru mineralizare.

Scanned with OKEN Scanner

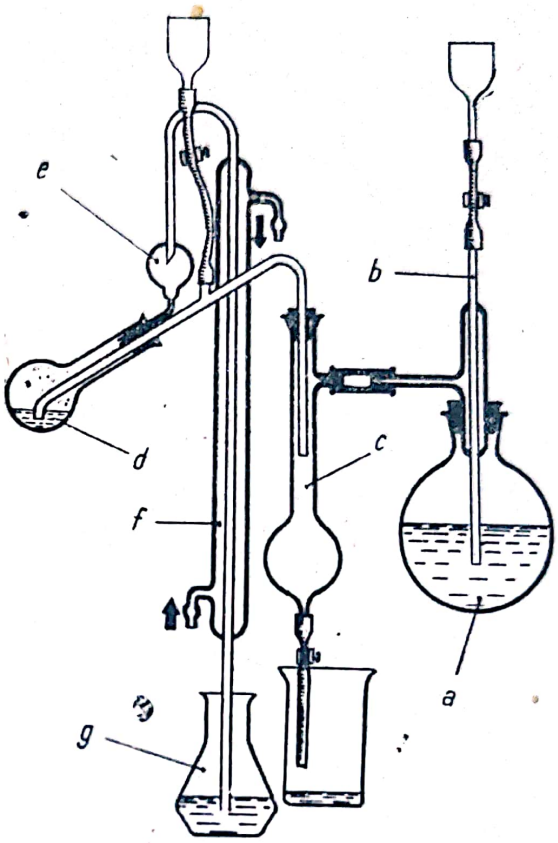


Fig. 41. — Aparatul Parnas-Wagner pentru distilarea amoniacului.

a, Generator de vapori de apă; *b*, tub deschis, regulator de presiune; *c*, condensator de vapori; *d*, vas de distilare sau balon Kjeldahl; *e*, deflegmator pentru împiedicarea antrenărilor; *f*, refrigerent; *g*, vas Erlenmayer pentru prinderea distilatului.

Dozarea amoniacului. În fiecare balon se adaugă aproximativ 5 ml de apă pentru diluarea acidului și baloanele se introduc în apă rece pentru a diminua încălzirea prea puternică care se produce prin adăugarea soluției saturate de NaOH (9 ml). Conținutul balonului se trece cantitativ în vasul de distilare. Această operație poate fi înlocuită folosind baloane Kjeldahl avînd gîtul cu o lungime și un diametru egal și care se pot adapta direct la aparatul de distilare. În acest caz se evită transvazarea, iar distilarea durează mai puțin, permițînd efectuarea analizelor în serie (22).

Apa generatorului de vapori este acidifiată ușor cu acid sulfuric. Este necesar ca înainte de a efectua distilarea propriu-zisă să se lase să treacă prin aparat vapori timp de 30 min. De asemenea, se poate face și o distilare martor cu toți reactivii întrebuințați la dozare, pentru a verifica starea de curățenie perfectă a aparatului. Dacă aparatul este perfect curat, indicatorul prezintă tenta sa intermediară.

Distilatul se prinde în vase Erlenmayer, care conțin 10 ml de acid boric și 2-3 picături din amestecul indicator (56). Cantitatea de acid boric nu trebuie măsurată exact, deoarece acesta nu acționează asupra indicatorilor, ci se titrează amoniacul ca și cum ar fi într-o soluție pură. Titrarea se efectuează cu o soluție de HCI N/100 pînă la viraj. 1 ml de HCl N/100 este echivalent cu 0,14 mg N. Distilarea amestecului de reactivi pentru stabilirea conținutului lor în azot (în special pentru acidul sulfuric) nu trebuie să dea un blanc care să consume mai mult de 0,05 ml HCl N/100. Cu o oarecare experiență se poate ajunge să se titreze cu o precizie de 0,01—0,02 ml, ceea ce corespunde la 1,4—2,4 μg azot.

Distilarea amoniacului se realizează în aparate construite după tipul Parnas-Wagner (fig.41). Unele tipuri permit folosirea probelor care conțin doar 10—100 de mg azot (31).

Capătul inferior al refrigerentului se introduce în soluția de acid boric. Se lasă să treacă vaporii, notînd momentul în care începe distilarea și care durează 6 min. Se coboară apoi vasul cu acid boric în așa fel încît

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 42. — Vas pentru microdifuziune (după M. D. Mezincescu și colab., 1956).

capătul inferior al refrigerentului să fie scos afară din lichid. Se clătește capătul cu un jet de apă distilată. Se întrerupe trecerea vaporilor cîteva secunde pentru a lăsa ca lichidul de condensare din deflegmator să cadă înapoi în vasul de distilare. Se face o a doua distilare timp de 1 min, pentru a recupera și urmele de amoniac care au fost reținute de apa de condensare din deflegmator. Viteza de distilare trebuie astfel reglată ca volumul distilatului să nu depășească 10-15 ml și să fie practic identic în toate probele.

Pentru dozarea amoniacului se pot folosi, în afara metodei de distilare, și metoda distilării izoterme, nesslerizarea și reacția cu ninhidrină.

Distilarea izotermă se efectuează în vase speciale de microdifuziune (33) cu două compartimente concentrice (fig. 42).

În compartimentul intern se pune acidul boric și indicatorul, iar în compartimentul exterior amestecul mineralizat. După alcalinizarea amestecului se închide vasul etanș și se incubează la 37°C, timp de 2-4 ore, interval în care amoniacul trece integral în compartimentul interior prin difuzie. Se scoate capacul și se titrează lichidul din compartimentul interior cu acid clorhidric N/100, folosind o microbiuretă. Sensibilitatea metodei este mare : 0,005-0,01 μg N.

Nesslerizarea (28), ca și reacția cu ninhidrină (16) sînt metode care permit aplicarea unor procedee sensibile, rapide și de rutină. Ele sînt însă mai puțin exacte. În timp ce distilarea are o precizie de ± 0,2%, precizia nesslerizării variază în funcție de cantitatea de azot dozată între 2-5%. Metoda cu ninhidrină citată (16) este la fel de sensibilă ca și distilarea și dă rezultate mai precise decît nesslerizarea.

Observații. Principalele erori în determinarea azotului se produc în timpul mineralizării și sînt cauzate de următoarele împrejurări :

a) Forma sub care se găsește azotul în proteină. Azotul triptofanului, lizinei și histidinei se convertesc greu în amoniac.

b) Adăugarea sărurilor (K_2SO_4) în cantitate excesivă. Se crește astfel temperatura mineralizării și se poate pierde amoniac prin descompunerea termică a $(NH_4)_2 SO_4$.

Scanned with OKEN Scanner

c) Întrebuinţarea catalizatorilor. Se pot folosi săruri de cupru, mercur şi seleniu. Mercurul este superior cuprului însă necesită o etapă suplimentară de descompunere a complexului amoniacal pe care îl formează. Seleniul determină o clarificare rapidă a mineralizatului însă poate produce pierderi de azot dacă nu se dozează riguros în raport cu ceilalţi reactivi (acidul sulfuric şi sulfatul de potasiu).

Pentru compuşi uşor de mineralizat, cel mai convenabil este cuprul. În cazul substanţelor greu de mineralizat, se poate folosi următorul amestec : 1 g K_2SO_4 + 0,1 g $CuSO_4$ $5H_2O$ şi 0,075 $HgSO_4$ pentru 2 ml H_2SO_4 conc. În acest caz, alcalinizarea mineralizatului se face cu o soluţie de NaOH 8 N conţinînd şi 20 g $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ la litru (10).

d) Întrebuinţarea agenţilor oxidanţi pentru grăbirea şi desăvîrşirea mineralizării poate determina pierderi de azot. Dintre agenţii recomandaţi (permanganat de potasiu, persulfat de potasiu, percloraţi) doar perhidrolul (H_2O_2) nu produce pierderi de azot. Totuşi, acest reactiv poate conţine impurităţi de azot, de aceea întrebuinţarea lui necesită paralel şi analiza blancurilor cu aceeaşi cantitate de apă oxigentă ca în probe.

e) Durata mineralizării. Mulţi experimentatori consideră că mineralizarea este terminată după limpezirea şi decolorarea probelor. În realitate, în unele cazuri, limpezirea şi decolorarea nu este o dovadă că mineralizarea este completă. Unii autori recomandă prelungirea mineralizării cu 50% peste timpul de limpezire şi decolorare.

f) Interferenţa deproteinizanţilor. Trebuie evitaţi agenţii care conţin azot (sulfatul de amoniu). Acizii tricloracetic şi fosfotungstic, folosiţi curent la deproteinizare, nu influenţează mineralizarea (45).

2. Metoda biuretului (52) (21) (1)

Principiul. Substanţele care conţin două sau mai multe legături peptidice formează un complex colorat prin tratare cu o soluţie diluată de sulfat de cupru în mediu alcalin. Proteinele dau o culoare violetă, iar peptonele şi peptidele dau o culoare roz.

Reactivi (12). Se dizolvă pe rînd, în 50 ml de apă distilată, 1,5 g de sulfat de cupru ($CuSO_4$. $5H_2O$) şi 6,0 g de tartrat dublu de sodiu şi potasiu (sare Seignette) ($C_4H_4O_6NaK$. $4H_2O$). După dizolvarea sărurilor se adaugă, sub agitare continuă, 300 ml NaOH 10% (preparat dintr-o soluţie stoc 75% lipsită de carbonat). Pentru prevenirea autoreducerii şi stabilizarea reactivului se poate adăuga 1 g iodură de potasiu. Prezenţa ei nu este obligatorie. Se aduce apoi restul la 1 litru cu apă distilată.

Se păstrează în vase de polietilenă sau de sticlă parafinată în interior. Dacă reactivul nu este corect preparat sau dacă se contaminează în timpul păstrării, apare un precipitat alb sau slab roşiatic, semn că reactivul trebuie schimbat.

Modul de lucru: La 1,0 ml de probă care conţine 1-10 mg/ml proteină se adaugă 4,0 ml reactiv biuret, se amestecă şi se lasă 30 min la temperatura camerii (20-25°C). Se citesc extincţiile la un fotocolorimetru în regiunea

Scanned with OKEN Scanner

540-560 mμ, față de un blanc preparat din 1,0 ml apă distilată sau soluție salină și 4,0 ml reactiv biuret. Concentrația proteică în probă se obține prin interpolarea citirilor într-o curbă etalon, obținută cu o proteină dată.

Observații. Specificitatea metodei este ridicată : dintre toate substanțele prezente în materialele biologice, numai proteinele dau reacția biuretului. Cu toate că intensitatea culorii formate cu diferite proteine nu este identică, deosebirile sînt mult mai mici decît în oricare metodă. Metoda are dezavantajul că necesită cantități mari de material.

Sensibilitatea metodei este mai mică decît a celorlalte tehnici aplicate curent, însă ea poate fi îmbunătățită. Citind extincțiile date de complexul colorat în regiunea ultravioletă a spectrului (263 mμ), se pot detecta pînă la 0,01 mg/ml proteină, ceea ce înseamnă că acest procedeu este de 10-15 ori mai sensibil decît reacția biuretului în spectru vizibil (15). Cu această modificare, metoda biuretului poate fi aplicată la dozarea proteinelor în eluatele cromatografice, ca și în alte soluții diluate.

Reacția este stînjenită de sărurile de amoniu, datorită formării complexului albastru de amină cuprică (47). Scăderea extincției variază de la 4%, pentru o concentrație în sulfat de amoniu de 0,08 M, pînă la 83% pentru 0,24 M. Interferența poate fi micșorată prin dializa soluțiilor.

3. Metoda Lowry (30)

Principiul. Metoda se realizează în două etape : *a*) reacția biuretului cu ioni de cupru în soluție alcalină și *b*) reducerea reactivului Folin-Ciocâlteu (fosfomolibdenic-fosfowolframic) de către proteina complexată cu cupru. Se formează o culoare albastră.

Reducerea reactivului Folin-Ciocâlteu poate fi făcută și de proteinele netratate cu ioni de cupru. În acest caz, culoarea este mai puțin intensă și este dată de tirozina, triptofanul și cisteina conținută în molecula proteică. Tratarea preliminară cu soluție alcalină de sulfat de cupru conduce la creșterea considerabilă a intensității culorii. Astfel, la reducerea reactivului Folin- Ciocâlteu participă, alături de tirozină și triptofan, și alte grupe funcționale existente în molecula proteică, ca legăturile peptidice (6). Deoarece numărul legăturilor peptidice este asemănător la diferite proteine, intensitatea culorii nu variază atît de mult de la proteină la proteină ca la metodele bazate numai pe dozarea triptofanului și tirozinei din molecula proteică (reacția Folin-Ciocâlteu fără pretratare cu cupru, metoda absorbției în UV la 280 mμ).

Metoda Lowry este larg răspîndită datorită simplității și sensibilității ei. Pentru determinarea proteinelor într-un număr mare de probe este recomandabilă folosirea unei variante care permite executarea în serie a experiențelor (34) (14).

Reactivi (34). Reactivul Folin-Ciocâlteu. Într-un balon cu gît rodat de 1,5—2 l se introduc pe rînd : 100 g de wolframat de sodiu ($Na_2WO_4\,2H_2O$), 25 g de molibdat de sodiu ($Na_2MoO_4.\,2H_2O$) și 700 ml de apă distilată. După dizolvare, se adaugă 50 ml de acid fosforic 85% și 100 ml

de acid clorhidric concentrat. Se montează un refrigerent şi se refluxează la flacără 10 ore. Se adaugă apoi 150 g sulfat de litiu dizolvat parţial în 50 ml de apă şi cîteva picături de brom. Soluţia se decolorează. Se fierbe din nou amestecul, de astă dată fără refrigerent, pentru a îndepărta excesul de brom. După 15 min se răceşte conţinutul la temperatura camerei, se diluează la 1 litru şi se filtrează. Reactivul trebuie să fie galben, fără nici o tentă verzuie, şi păstrat într-o sticlă brună, curată, care se poate închide etanş. Înainte de scoaterea dopului, el se şterge cu grijă, deoarece chiar materialul organic din praf poate reduce reactivul. Înainte de întrebuinţare se diluează reactivul în proporţie de 1 parte reactiv + 10 părţi apă distilată.

— Reactivul alcalin cu cupru :

A. Na_2CO_3 10 g%, dizolvat într-o soluţie de NaOH 0,5 N ;

B. $CuSo_4$ $5H_2O$ 0,5 g%, dizolvat într-o soluţie de citrat de sodiu 1 g% (19) (în locul citratului de sodiu poate fi folosită aceeaşi concentraţie de tartrat de potasiu (30) însă în aceste cazuri reactivul este mai nestabil).

Înainte de întrebuinţare se amestecă 10 părţi din reactivul A cu 1 parte din reactivul B.

Modul de lucru. La 1 ml de probă conţinînd 5—100 g proteină, se adaugă 1 ml de reactiv alcalin cu cupru. Se amestecă şi se lasă să stea 10 min la temperatura camerei. După aceea se adaugă cît mai repede posibil 3 ml din reactivul Folin-Ciocâlteu diluat, amestecînd conţinutul eprubetei. Se introduce apoi proba într-o baie de apă la 50°C timp de 10 min, după care se răceşte şi se citeşte la fotocolorimetru faţă de apă distilată. Extincţiile se determină la 650 mμ pentru soluţii proteice diluate (<25 μg/ml) şi la 540 mμ pentru soluţii mai concentrate. Valorile citite se introduc într-o curbă de etalonare construită cu ajutorul unei proteine pure. Se calculează concentraţia proteică a soluţiei cercetate. Dacă la o concentraţie echivalentă proteina determinată dă o intensitate de culoare diferită de proteina etalon, trebuie făcute corectările necesare.

Precizări. a) Adăugarea reactivului Folin-Ciocâlteu trebuie făcută rapid, deoarece în mediu alcalin reactivul se distruge repede. Pentru dezvoltarea culorii, amestecul trebuie să aibă un pH în jur de 10. De aceea, respectarea riguroasă a alcalinităţii mediului este o condiţie care asigură reproductibilitatea experienţelor.

b) Încălzirea probelor la 50°C nu este absolut necesară. Dezvoltarea culorii poate fi făcută şi la temperatura camerei însă în acest caz ea durează mai mult (45 min).

c) Proteinele precipitate (de ex. complexele antigen — anticorp) pot fi reluate direct în reactivul alcalin cu cupru. Chiar şi precipitatele insolubile, obţinute cu acid tricloracetic, se dizolvă datorită concentraţiei hidroxidului din reactiv (0,5 N).

d) Trebuie evitată folosirea albuminei serice bovine ca etalon, deoarece, în soluţii diluate, această proteină are tendinţă să se denatureze.

Observaţii. Dintre substanţele care se găsesc în mod obişnuit în materialele biologice, numai puţine interferează metoda Lowry. Astfel, nu s-au obţinut colorаţii cu o serie de substanţe în următoarele concentra-

Scanned with OKEN Scanner

ţii finale: uree (0,5%), guanidină (0,5%), wolframat de sodiu (0,5%), sulfat de sodiu (1%), sulfat de zinc (0,1%), azotat de sodiu (1%) acid percloric neutralizat (0,5%), acid tricloracetic neutralizat (0,5%), hidroxid de bariu (0,1%), etanol (5%), eter etilic (5%), acetonă (0,5%).

Triptofanul, tirozina şi mulţi fenoli (cu excepţia nitrofenolului), acidul uric, guanidina şi xantina dau coloraţia cu reactivul Folin-Ciocâlteu. Restul bazelor azotate şi nucleozidele respective nu dau decît o reacţie foarte slabă.

Sulfatul de amoniu (>0,15%) şi glicina (0,5%) scad intensitatea reacţiei. Hidrazina (>0,5 mg%), sărurile de potasiu (KCl⩾0,5% (49) şi acidul sulfosalicilic perturbează de asemenea reacţia.

Metoda are două dezavantaje: intensitatea culorii variază de la proteină sub acest aspect, metoda Lowry fiind mai puţin constantă decît reacţia biuretului, dar mai constantă decît absorbţia la 280 mμ; culoarea nu este strict proporţională cu concentraţia.

4. Metoda absorbţiei în UV (29) (18)

Principiul. Majoritatea proteinelor prezintă o absorbţie caracteristică a luminii ultraviolete între 270 şi 290 mμ, maximul fiind situat în jur de 280 mμ. Absorbţia se datoreşte prezenţei în molecula proteică a tirozinei, triptofanului şi, într-o măsură mai mică, a fenilalaniei. Deoarece conţinutul în tirozină şi triptofan al diferitelor proteine oscilează între limite relativ înguste, absorbţia luminii în UV la 280 mμ poate fi folosită ca o metodă sensibilă şi rapidă de măsurare a concentraţiei proteice.

Aparatura. Se folosesc spectrofotometre (Beckman, Zeiss etc.). Aparatele emit o lumină cuprinsă între 200 şi 1000 mμ, de aceea pot fi folosite pentru măsurători în ultraviolet, vizibil şi în infraroşu. Sursa de lumină, o lampă cu hidrogen, este capabilă să dea un spectru continuu în zona ultravioletă (200—350 mμ). Cuvele folosite pentru regiunea ultravioletă sînt din cuarţ, avînd o capacitate şi o grosime variabilă. În mod curent se folosesc cuve cu o capacitate minimă de 1 ml. Există şi microcuve pentru volume mai mici (0,1—0,2 ml).

Modul de lucru (51). Se diluează probele, aducînd concentraţia lor proteică în zona pentru care s-a construit curba etalon. Nu se pot determina cantităţi de proteină sub 100 μg/ml. Valorile citite se introduc în curba etalon şi se determină concentraţia proteică.

Precizări. a) Deoarece pH-ul soluţiei influenţează maximul de absorbţie, este bine ca măsurătorile să se facă la un pH constant. Se folosesc de obicei soluţiile alcaline (NaOH 0,1 N). Această posibilitate este exploatată la dozarea cantităţii de antigen sau anticorp din precipitatele imune. Precipitatele spălate se reiau într-o soluţie de NaOH 0,1 N şi se citesc la spectrofotometru (18). În unele cazuri, pentru reluarea precipitatelor se poate folosi şi o soluţie de acid acetic 0,25 N. Deşi în

Scanned with OKEN Scanner

soluţii acide metoda absorbţiei în UV este mai puţin sensibilă, ea are o reproductibilitate mai bună.

b) Proteinele cu greutate moleculară mare nu trebuie determinate la concentraţii mai mari de 1 mg/ml, deoarece determină dispersia luminii (55).

c) Determinările nu sînt valabile dacă soluţiile proteice sînt impurificate cu acizi nucleici, care au absorbţie puternică în regiunea 280 mμ. Totuşi, se poate măsura concentraţia proteică şi într-o astfel de probă, deoarece acizii nucleici au un maxim de absorbţie la 260 mμ, iar proteinele la 280 mμ (55). Se citesc extincţiile la 260 mμ şi 280 mμ, iar valorile găsite se introduc în ecuaţia : proteină (mg/ml) = 1,45 E_{280} mμ — 0,74 E_{260} mμ, cu care se calculează concentraţia proteică. Metoda este destul de precisă dacă probele nu conţin mai mult de 20% acizi nucleici.

Observaţii. Metoda absorbţiei în UV permite o determinare rapidă a concentraţiei proteice, folosind cantităţi mici de material şi condiţii experimentale în care alte metode nu pot fi aplicate. Astfel, spre deosebire de reacţia biuretului şi de metoda Lowry, determinările nu sînt stînjenite de concentraţii moderate de sulfat de amoniu şi de alte săruri. În schimb, determinarea absorbţiei la 280 mμ este stînjenită de toate substanţele care sînt capabile să absoarbă lumină la această lungime de undă. Astfel sînt acizii nucleici, bazele azotate, nucleotidele, amidonul, agarul etc. Ultimele două componente intervin în eluatele proteinelor fracţionate prin electroforeză pe amidon sau gel.

Măsurarea absorbţiei la 215/225 mμ (50). Eliminarea interferenţelor citate mai sus poate fi realizată efectuînd măsurători într-o altă regiune a spectrului ultraviolet, în care proteinele absorb puternic. Determinarea proteinelor se bazează pe măsurarea extincţiilor la 215 şi 225 mμ. Probele se diluează cu soluţie salină fiziologică pînă cînd extincţiile la 215 mμ devin mai mici de 1,5 (grosime de strat 1 cm). Din extincţiile determinate la 215 mμ se scad extincţiile citite la 225 mμ. Diferenţa se înmulţeşte cu coeficientul de extincţie 144 şi se obţine concentraţia proteică în probă, în mg/ml. Deoarece nu toate proteinele au acelaşi coeficient de extincţie, este bine să se folosească o curbă etalon construită cu proteina studiată. Pe abscisă se trece concentraţia proteică, iar pe ordonată diferenţa extincţiilor ($E_{215} - E_{225}$).

În această regiune a ultravioletului, determinările sînt interferate de ionii de acetat, succinat, citrat, ftalat şi barbiturat, în concentraţii mai mari de 0,1 M (35). De asemenea nu poate fi întrebuinţată ca solvent o soluţie de NaOH 0,1 N, deoarece absoarbe în această regiune a spectrului (48).

Metoda de determinare a absorbţiei la 215 şi 225 mμ este mai sensibilă decît determinarea absorbţiei la 280 mμ. Astfel la 215—225 mμ se poate doza cu o precizie satisfăcătoare 20 μg/ml de proteină, în timp ce determinarea la 280 mμ este insensibilă la concentraţii proteice sub 100 μg/ml. De aceea, măsurarea absorbţiei la 215—225 mμ este recomandabilă în special pentru proteinele sărace în tirozină şi triptofan (proteinele cerebrale). Sensibilitatea determinărilor la 215—225 mμ este asemănătoare

Scanned with OKEN Scanner

cu aceea a metodei Lowry, precizia ambelor metode fiind în jur de 10% (19). Absorbţia proteinelor la 215—225 mμ este practic independentă de pH între valorile 5 şi 10 (35).

5. Metoda legării coloranţilor

Proteinele au capacitatea de a se combina cu coloranţii anionici prin intermediul unor legături de tip salin. Cantitatea colorantului legat depinde de numărul grupărilor reacţionabile din molecula proteică. Deoarece cantitatea de colorant legată este proporţională cu cantitatea de proteină, fixarea coloranţilor poate sta la baza unor metode analitice de determinare a proteinelor.

Există două posibilităţi de aplicare a legării coloranţilor la determinarea concentraţiei proteice :

a) Efectuarea reacţiei dintre proteină şi coloranţi pe un suport solid (hîrtie de filtru). Colorantul liber, aflat în exces, se îndepărtează, iar colorantul legat se eluează din hîrtie şi se determină cantitativ prin fotometrie. Această metodă analitică a fost sugerată de practica colorării electroforeogramelor, de aceea se pot folosi coloranţii care servesc în mod obişnuit la electroforeză pe hîrtie. Dintre aceştia, mai utilizat este albastrul de bromfenol.

b) Efectuarea reacţiei dintre proteină şi colorant în mediu lichid, în condiţii experimentale, în care colorantul precipită proteinele. Dintre coloranţii care se pretează la acest fel de analize, cel mai folosit este bromsulfoftaleina (BSP).

Atît albastrul de bromfenol, cît şi bromsulfoftaleina conţin gruparea $-SO^-_3$, prin intermediul căreia se leagă de grupările aminice libere, în special de gruparea ε-amină a lizinei, aflată la suprafaţa moleculei proteice.

Metoda cu albastru de bromfenol (13) (12)

Principiul. Proteinele fixate de hîrtia de filtru prin denaturare termică au capacitatea de a lega albastrul de bromfenol proporţional cu cantitatea lor. Excesul de colorant nelegat se îndepărtează de pe hîrtia de filtru prin spălare, iar colorantul legat se desface de proteină prin eluţie şi se determină fotometric în regiunea de absorbţie maximă. Valorile obţinute se introduc într-o curbă etalon (concentraţie proteică — extincţie colorant legat) construită cu o proteină oarecare.

Reactivi. Soluţie de albastru de bromfenol. Se cîntăresc 0,1 g de albastru de bromfenol, 5 g $HgCl_2$ şi se aduc la 90 ml cu etanol 96°. După dizolvarea substanţelor se adaugă 10 ml acid acetic glacial. Soluţia se conservă bine într-o sticlă închisă etanş.

— Soluţie de spălare (acid acetic 2%).

— Eluant alcalin. Se dizolvă 100 g de carbonat de sodiu ($Na_2CO_3 \cdot 2H_2O$) în 500 ml de apă distilată. După dizolvarea completă, se adaugă

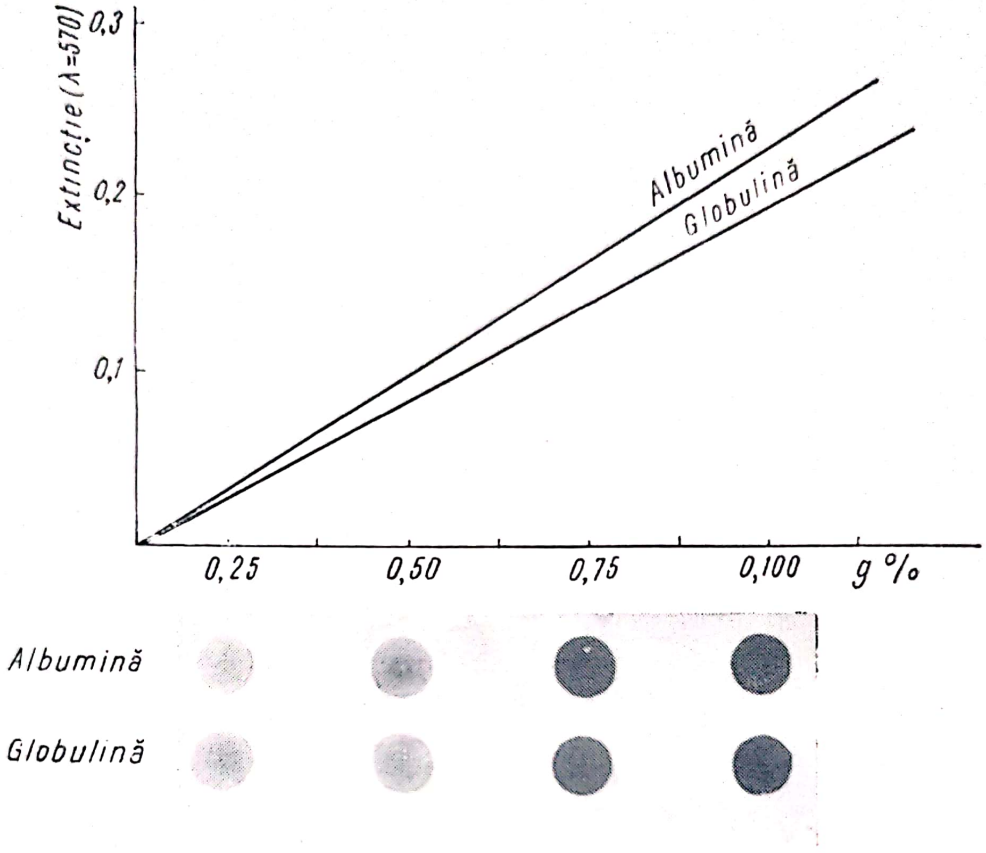


Fig. 43. — Curbe etalon construite cu albumină și γ-globulină serică de bou.

încet, sub agitare puternică și continuă, 500 ml de metanol. Eluantul trebuie să fie perfect limpede.

Modul de lucru. Pe o bucată de hîrtie de filtru Whatman 1 se aplică cu o micropipetă din soluția proteică analizată 3 spoturi de cîte 10 μl fiecare. Se lasă să se usuce hîrtiile la temperatura camerei și se introduc în etuvă la 110—120°C timp de 30 min, pentru denaturarea proteinelor. Se introduce apoi hîrtia într-o cutie Petri și se acoperă cu soluția de albastru de bromfenol. După 45 min se îndepărtează colorantul și se spală hîrtia de filtru de cîteva ori cu soluție de acid acetic 2% pînă ce în jurul spotului colorat hîrtia devine complet albă. Se usucă la temperatura camerei, se decupează cele trei spoturi, se taie în fîșii mărunte și se introduc în 3 eprubete. În fiecare eprubetă se toarnă apoi cîte 3 ml de eluant alcalin, se astupă și se agită ocazional. Eluția durează 30 min, timp în care fîșiile de hîrtie se decolorează complet. Se citesc apoi probele într-un fotocolorimetru la 540 mμ (grosime de strat 1 cm) și se face media celor trei extincții. Dacă s-a pipetat corect, diferența dintre cele trei valori nu trebuie să depășească 0,2%. Media citirilor se introduce într-o curbă etalon, construită de preferință chiar cu proteina care se determină (fig. 44).

Observații. Pentru a obține colorații cu intensitate măsurabilă fotometric, trebuie aplicat pe hîrtia de filtru minimum 10 μg de proteină.

Scanned with OKEN Scanner

Deci, metoda cu albastru de bromfenol, în condiţiile experimentale descrise mai sus, nu permite determinarea concentraţiei proteice în soluţii care conţin mai puţin de 1 mg/ml proteină.

Sensibilitatea metodei poate fi îmbunătăţită astfel: se pipetează din soluţia proteică un volum mai mare (20—30 µl), se eluează spotul colorat într-un volum mai mic (0,5—1,0 ml) sau se fotometrează în microcuve cu o grosime de strat mai mare (2—5 cm). Aplicînd simultan aceste procedee, sensibilitatea metodei creşte de 30—50 de ori.

Specificitatea metodei este satisfăcătoare; doar unii aminoacizi (glicocol, lizină, histidină, metionină şi arginină), precum şi bazele purinice (39) au capacitatea de a lega colorantul. Acizii nucleici nu se colorează decît foarte slab cu albastru de bromfenol.

Metoda permite dozarea proteinelor în soluţii colorate (impurificate cu pigmenţi) la care nu este posibilă aplicarea metodelor colorimetrice uzuale. Astfel, se pot doza substanţele proteice în extractele şi în sucurile plasmatice obţinute din frunze şi care sînt intens colorate datorită pigmenţilor clorofilieni şi a produşilor de oxidare (17). În aceste cazuri, soluţia alcoolică în care este dizolvat albastru de bromfenol serveşte la îndepărtarea pigmenţilor şi produşilor de oxidare, care nu mai apar astfel în eluant.

Principalul dezavantaj al metodei este determinat de faptul că numărul de grupări reacţionabile, accesibile colorantului, diferă de la proteină la proteină. În consecinţă, cantităţi egale de proteină vor fixa cantităţi variabile de colorant, deci şi curbele lor etalon vor avea coeficienţii de extracţie diferiţi (fig. 43). Mai mult decît atît, sînt proteine ca tripsina, care nu fixează albastru de bromfenol decît foarte slab. De aceea, determinarea concentraţiei într-un amestec de proteine a căror afinitate pentru coloranţi este necunoscută poate fi afectată de erori considerabile, dacă se foloseşte o curbă etalon construită cu o proteine pură. Pentru a furniza rezultate valabile, metoda cere construirea curbelor etalon cu o proteină asemănătoare sau chiar identică cu cea care urmează a fi determinată în diferite probe. În caz contrar, rezultatele pot fi folosite doar pentru orientare.

Albastrul de bromfenol poate fi înlocuit cu negru amido-10 B (amidoschwarz) (46) care, după unii autori, dă rezultate mai uniforme cu diferite proteine (23).

Metoda cu bromsulfoftaleină (BSP) (36) (20)

Principiul. Metoda se bazează pe capacitatea bromsulfoftaleinei de a precipita în mediu acid proteinele din soluţie. Supernatantul rămas după îndepărtarea precipitatului are o intensitate a culorii mai mică decît soluţia de colorant iniţială datorită legării unei părţi din BSP de proteină. Scăderea intensităţii culorii este proporţională cu cantitatea de proteină precipitată, de aceea, cu ajutorul unei curbe etalon se poate determina concentraţia proteică a soluţiilor analizate. Bromsulfoftaleina fiind un indicator redox, dezvoltă o culoare violetă numai în soluţie alcalină. Din acest motiv, supernatantul rămas după îndepărtarea precipi-

Scanned with OKEN Scanner

tatului proteină — BSP se amestecă cu un volum determinat de NaOH 0,1 N.

Metoda cu BSP poate fi aplicată şi într-o altă variantă (37) : precipitatul proteină — BSP se spală pentru îndepărtarea urmelor de supernatant, se dizolvă într-un volum fix dintr-o soluţie alcalină, se fotometrează, iar valorile obţinute se introduc într-o curbă etalon construită prin evaluarea fotometrică a colorantului legat de proteină.

Metoda cu BSP s-a folosit în special la dozarea proteinelor din precipitatele imune, în vederea construirii curbelor de precipitare antigen — anticorp (37) (38). Metoda permite dozarea precipitatelor imune care rezultă prin amestecarea unor volume mici (10—100 µl) din antigen cu serul imun corespunzător. Mai jos va fi redată tehnica de lucru aplicată în acest scop.

Reactivi. Reactivul cu bromsulfoftaleină. La 1 ml dintr-o soluţie apoasă de BSP 5 g% se adaugă 100 ml HCl 1 N şi 50 ml de acid citric 1 M. Se aduce la 250 ml cu apă distilată.

— Soluţie de NaOH 1 N pentru dizolvarea precipitatului imun.

— Soluţie de NaOH 0,1 N pentru dezvoltarea culorii.

Modul de lucru. Se efectuează reacţiile imune de precipitare între 10 µl ser imun şi 10 µl antigen corespunzător, în eprubete de 3 cm lungime şi 0,5 cm diametru interior. Precipitatele imune centrifugate se spală de 2—3 ori cu soluţie salină fiziologică rece şi apoi se usucă într-un exsicator de vid. Se dizolvă proteinele în 20 µl NaOH 1 N prin lovirea uşoară a eprubetelor în partea lor inferioară. După dizolvarea completă a precipitatelor, se adaugă în fiecare eprubetă 50 µl de reactiv cu BSP şi se amestecă. După 15 min se centrifughează conţinutul eprubetelor la temperatura camerei 5 min la 3 800 g. Se scot cîte 60 µl din supernatantele limpezi şi se amestecă cu 1 ml NaOH 0,1 N. Se dezvoltă o culoare violetă, a cărei intensitate, după amestecare, se măsoară la 580 mµ, iar valorile citite se trec într-o curbă etalon din care se calculează cantitatea de proteină prezentă în probele analizate.

Curbele etalon se construiesc adăugînd peste cantităţi cunoscute şi variabile de proteine o cantitate fixă de colorant. După îndepărtarea precipitatului şi alcalinizarea supernatantului, probele se fotometrează faţă de apă distilată. Blancul se efectuează înlocuind soluţia proteică cu apă. Valoarea blancului se trece pe ordonata extincţiilor, concentraţia proteică fiind considerată zero. În figura 44 este redată curba etalon cu albumină serică obţinută astfel : se adaugă 50 µl de soluţie de colorant (12 g colorant dizolvat în 100 ml tampon

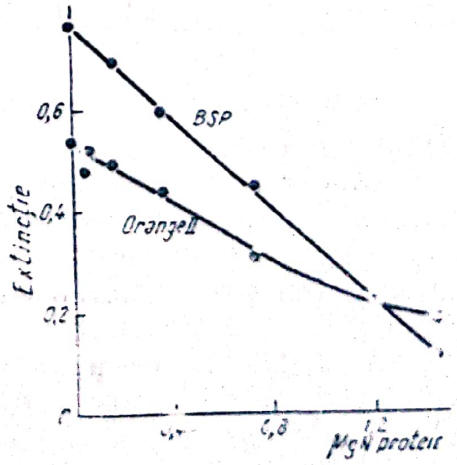


Fig. 44. — Curba etalon cu albumină serică pentru determinarea concentraţiei proteice (după D. Glick şi colab., 1958).

acid citric-fosfat disodic 0,1 N, pH 2,0) la 20 µl din soluția de albumină. Se lasă 15 min în repaus, apoi se îndepărtează precipitatul prin centrifugare la 3 800 g, timp de 5 min. Se adaugă apoi 60 µl din supernatantul limpede la 0,5 ml NaOH 0,1 N și se fotometrează.

Determinarea proteinelor din precipitatele imune poate fi efectuată și prin măsurarea cantității de colorant legată de proteină. În acest caz, precipitatele de proteină—BSP se îndepărtează prin centrifugare, se spală cu HCl 0,01 N și se trec în alte eprubete cu ajutorul unui volum măsurat de NaOH 0,1 N, avînd grijă să nu se antreneze din colorantul liber absorbit pe pereții eprubetelor. Se fotometrează probele și se integrează valorile într-o curbă etalon, construită special.

Observații. Metoda este sensibilă, permite dozarea proteinelor în volume de 100 pînă la de 1 000 de ori mai mici decît cele folosite în mod curent și dă rezultate reproductibile. Corespondența dintre valorile determinate prin metoda cu BSP și metoda microkjeldahl este excelentă (20). Legarea colorantului de diferite proteine este destul de uniformă, de aceea sub acest aspect metoda cu BSP este superioară metodei cu albastru de bromfenol (36).

La aplicarea metodei trebuie respectat riguros pH-ul mediului de reacție. Cu cît pH-ul este mai ridicat, cu atît se leagă o cantitate mai mică de colorant și precipitatul devine mai solubil. Între pH-urile 1,5—2,8, proteinele leagă o cantitate aproximativ egală de BSP. Pentru dezvoltarea culorii este necesar un pH de 10,25 sau mai mare, realizat prin adăugarea soluției 0,1 N de hidroxid de sodiu.

La dozarea proteinelor, în afara bromsulfoftaleinei, poate fi întrebuințat și colorantul orange II (sarea monosodică a acidului p-(2-hidroxi-1-naftilazo)-benzen-sulfonic) (53). Absorbția maximă se citește la 490 mµ. Metoda nu se poate folosi în medii de reacție cu putere ionică mai mare de 0,2, deoarece precipită colorantul, iar curba de etalonare nu este liniară la concentrații proteice mai mari (fig. 44). În plus, pentru aceeași concentrație proteică, extincțiile citite folosind orange II sînt mai mici decît cu BSP.

II. ANTIGENE POLIZAHARIDICE

Metodele de determinare a polizaharidelor se bazează pe capacitatea glucidelor care compun macromolecula de a da reacții caracteristice. Sînt folosite cu precădere două proprietăți ale glucidelor : puterea reducătoare, determinată de grupările aldehidice sau cetonice ; formarea complecșilor colorați cu aminele, fenolii aromatici și anumiți compuși sulfhidrilici. Această reacție este posibilă numai în urma transformării prealabile a glucidelor în derivați furanici (furfuralul și omologii săi).

Reacțiile bazate pe măsurarea proprietăților reducătoare ale glucidelor se pot aplica numai după hidroliza acidă prealabilă a polizaharidelor. Hidroliza eliberează grupările reactive blocate prin legăturile glicolitice.

Scanned with OKEN Scanner

Măsurarea puterii reducătoare a glucidelor are următoarele dezavantaje : *a*) nu se poate aprecia cantitatea de polizaharid care se distruge în timpul hidrolizei ; *b*) nu se poate aplica în prezența proteinelor ; *c*) este puternic interferată de multe substanțe capabile să reducă reactivul folosit.

Reacțiile bazate pe formarea derivaților furanici nu necesită o hidroliză prealabilă, deoarece formarea ciclului furanic are loc și fără ruperea legăturilor glicozidice (39). Metodele colorimetrice, bazate pe formarea derivaților furanici, sînt mult mai specifice, nu sînt influențate de prezența proteinelor și de alte substanțe reducătoare. În schimb, nu se știe dacă capacitatea de a forma derivați furanici este identică la zaharurile din polizaharide și la cele libere. Aceste metode nu sînt specifice pentru un glucid oarecare și nici chiar pentru o clasă întreagă de glucide. Astfel, toate hexozele au capacitatea de a da o anumită reacție de culoare cu reactivul folosit. Chiar și pentozele pot da reacțiile de culoare ale hexozelor. Între două zaharuri pot exista însă diferențe mari, atît în ce privește aspectul curbei de absorbție (culoarea dezvoltată), cît și mărimea extincției (intensitatea culorii). De aceea, s-au putut elabora metode care permit determinarea unui glucid dat în prezența altor glucide.

La aplicarea metodelor colorimetrice trebuie avut în vedere că în țesuturile și în lichidele biologice din care se extrag polizaharidele pot exista substanțe neglucidice, care perturbă reacțiile de culoare. Acestea sînt : *a*) substanțe de natură lipidică (steroli) ; ei produc o culoare galbenă sau brună cu acizii puternici folosiți la prepararea reactivilor. *b*) Cisteina și triptofanul ; ei pot reacționa cu glucidul, formînd un compus colorat care stînjenește culoarea dată de reactiv. *c*) Substanțe care pot reacționa cu reactivul folosit ; acestea vor fi indicate la fiecare metodă în parte.

Toate metodele de determinare colorimetrică a polizaharidelor folosesc curbe etalon care se construiesc cu monozaharidele ce alcătuiesc molecula polizaharidului cercetat. Deoarece în cursul dozării se pot face manipulări greșite, care modifică rezultatele, ca o regulă generală, toate determinările se fac în duplicat, iar alături de probe se face întotdeauna și un standard cu o cantitate cunoscută de glucid. Dacă apar diferențe semnificative între cantitatea de glucid introdusă în standard și cea determinată prin curba etalon, experiențele se repetă. Dacă diferențele se mențin, trebuie schimbați reactivii.

Folosirea acidului sulfuric pentru transformarea glucidelor în derivați furanici poate perturba reacțiile de culoare dacă în proba analizată există substanțe neglucidice cromogene. În aceste cazuri, alături de blancul reactivilor și de standardul cu glucidul pur, mai trebuie efectuat un blanc în care peste probă se adaugă toți reactivii, mai puțin substanța care produce culoarea. Extincțiile citite se scad din extincțiile probei.

Pentru alegerea celei mai adecvate metode de dozare a antigenelor polizaharidice este necesară cunoașterea tipurilor de glucide care compun macromolecula. Fără aceste date, experimentatorul trebuie să aplice o metodă generală, care dă, cu diferite clase de glucide, intensități de culoare și un aspect al curbei de absorbție asemănătoare. Deci, la dozarea unui polizaharid cu o compoziție chimică necunoscută, se vor aplica me-

Scanned with OKEN Scanner

todele generale care folosesc reactivi ce dezvoltă culori asemănătoare cu toate tipurile de zaharuri. În acest fel se face o estimare globală a polizaharidului din amestec.

Pentru a stabili natura chimică a monozaharidelor care intră în compoziția macromoleculei, cît și proporția lor relativă se folosește un reactiv ce dezvoltă culori diferite cu principalele grupe de monozaharide (hexoze, pentoze, metilpentoze etc.) După această operație se aplică metodele speciale prin care se dozează specific fiecare glucid prezent în polizaharid.

Deci, determinarea, polizaharidelor cu o compoziție chimică necunoscută implică parcurgerea a două etape principale :

a) Aplicarea metodelor generale de dozare. Se stabilește pe această cale atît cantitatea de polizaharid prezent, cît și natura chimică a monozaharidelor care alcătuiesc macromolecula. Metoda cu orcinol poate servi la dozarea globală a polizaharidului, iar metoda cu cisteină — acid sulfuric diferențiază monozaharidele care compun macromolecula.

b) Aplicarea metodelor specifice de dozare. Se determină hexozele, metilpentozele, pentozele, hexozaminele, acidul sialic, fucoza etc. Aceste procedee se aplică în special pentru determinarea conținutului în zaharuri a polizaharidelor și a glicoproteinelor, datele obținute servind mai mult la caracterizarea produșilor decît la dozarea lor (42).

1. Metode generale (2)

Principiul. Glucidele reacționează cu acidul sulfuric concentrat ; pentozele formează furfurol, iar hexozele se transformă în 5-hidroximetil-2-furfuraldehidă (40). Cantități mici de formaldehidă și acetaldehidă se formează cu ambele tipuri de glucide. Aldehidele formate au capacitatea de a da compuși colorați prin condensare sau polimerizare cu orcinolul, α-naftolul, triptofanul și cisteina.

Metoda cu orcinol pentru dozare globală (54)

Reactivi. — amestecul orcinol-acid sulfuric :

A. 60 ml H_2SO_4 conc. se amestecă cu 40 ml de apă distilată ;

B. 1,6 g de orcinol (recristalizat din benzen) se dizolvă în 100 ml de apă distilată.

Înainte de întrebuințare se amestecă 7,5 părți din reactivul A cu 1 parte din reactivul B.

Modul de lucru. Se ia 1 ml din proba analizată (0,1—0,5 mg glucide) și se amestecă bine cu 8,5 ml reactiv orcinol-acid sulfuric. În mod asemănător se prepară un blanc, folosind 1 ml de apă distilată. Se astupă eprubetele, se introduc într-o baie de apă de 80°C, în care se țin exact 15 min. Se răcesc eprubetele în apă și se citesc imediat la 540 mμ. Extincția

citită se raportează la o curbă etalon construită cu o hexoză oarecare sau cu un amestec de hexoze.

Acest procedeu se aplică și la determinarea hexozelor legate de proteină (γ-globulină). Fracțiunile proteice în stare perfect uscată (2—10 mg) se dizolvă în NaOH 0,1 N și apoi se analizează. Dacă se determină glucidele legate de proteinele serice, este preferabilă folosirea curbelor etalon, construite cu un amestec de galactoză—manoză (1 : 1), deoarece aceste două hexoze se găsesc în cantitate aproximativ egală în glicoproteinele serice.

Observații. Sensibilitatea reacției cu orcinol este mult mai mare la 420 mμ decît la 540 mμ. Totuși, ultima lungime de undă trebuie preferată atunci cînd se determină concentrația globală a polizaharidului, deoarece la 540 mμ diferențele de culoare dintre diferitele hexoze, ca și dintre hexoze și pentoze sînt mai puțin accentuate. Diferența de culoare, care se manifestă la 420 mμ, poate introduce erori considerabile, mai ales dacă glucidele care compun polizaharidul diferă de cele cu care s-a construit curba etalon.

Reacția de culoare este dată de hexoze, pentoze și metilpentoze. Hexozaminele, fucoza și acidul sialic nu reacționează cu orcinolul în aceste condiții experimentale. De asemenea, proteinele nu interferează determinarea dacă nu sînt colorate și dacă au un conținut scăzut în glucide.

Reproductibilitatea metodei este satisfăcătoare. Extincțiile variază liniar cu cantitatea de glucide, pînă la concentrații de 0,5 mg/ml hexoză.

Metoda cu cisteină pentru identificarea componentelor (7) (8).

Reactivi — Amestec de apă — acid sulfuric (6 volume acid sulfuric conc., liber de azot și arsen + 1 volum apă).

— Soluție de clorhidrat de cisteină 3%. Se prepară săptămînal și se păstrează la frigider.

Modul de lucru. Peste 1 ml din soluția polizaharidului cu compoziție chimică necunoscută se adaugă la 4 ml amestec de apă — acid sulfuric. Se lasă amestecul să stea la temperatura camerei 1 oră, timp în care se scutură des pentru a împiedica formarea bulelor de aer. Temperatura rezultată prin amestecarea acidului sulfuric conc. cu apa determină formarea derivaților furanici. După 1 oră se adaugă 0,1 ml din soluția de cisteină și amestecul se scutură. Se trasează curba de absorbție a amestecului analizat la diferite intervale de timp de la adăugarea cisteinei.

Analiza curbelor de absorbție și detectarea glucidelor. Deoarece reactivul dă culori caracteristice cu heptozele, hexozele, pentozele și metipentozele, aceste patru categorii de glucide pot fi detectate în aceeași probă.

Scanned with OKEN Scanner

Hexozele se recunosc după culoarea lor galbenă, stabilă în timp, neinfluenţată de adăugarea apei.

Prezenţa pentozelor şi metilpentozelor se dovedeşte măsurînd absorbţia la 390 mμ şi la 424 mμ; hexozele absorb identic la ambele lungimi de undă. Dacă diferenţa extincţiilor (E_{390} mμ — E_{424} mμ) este nulă, în probă sînt prezente numai hexozele. Dacă diferenţa este pozitivă, în amestec sînt prezente pentozele sau metilpentozele. Dacă sînt prezente numai pentozele, diferenţa extincţiilor scade rapid după 15—20 min de la adăugarea cisteinei. Dacă sînt prezente numai metilpentozele, diferenţa extincţiilor creşte continuu. Dacă sînt prezente atît pentozele, cît şi metilpentozele, se adaugă la amestecul de reacţie 1 ml de apă distilată şi se urmăreşte imediat variaţia extincţiei. În timp ce extincţia determinată de pentoze (390 mμ) scade rapid, pînă la un procent neînsemnat din culoarea maximă iniţială, pentru metilpentoze intensitatea culorii creşte rapid şi se obţine o curbă de absorbţie cu un maxim de 400 mμ. Deoarece coeficientul de extincţie pentru metilpentoze este de cîteva ori mai mare decît cel al pentozelor, se pot detecta cantităţi mici de metilpentoze chiar în prezenţa unui exces de pentoze.

Prezenţa heptozelor interferează de obicei această reacţie. Acestea pot fi evidenţiate uneori prin dezvoltarea treptată, în cîteva ore, a unei culori purpurii cu un maxim de absorbţie la 510 mμ.

Observaţii. Prin această reacţie se obţin foarte repede indicaţii asupra tipurilor de glucide care compun preparatele polizaharidice. Aceste tipuri pot fi diferenţiate unul de altul atît datorită faptului că dezvoltarea culorii, ca şi distrugerea ei, depinde de concentraţia acidului sulfuric, cît şi datorită vitezei diferite cu care apare culoarea.

2. Metode specifice

METODA BIAL MODIFICATĂ PENTRU PENTOZE (8) (11) (32)

Principiul. Formarea derivaţilor furanici este realizată cu acid clorhidric conc., iar culoarea se dezvoltă în urma reacţiei cu orcinolul în prezenţa clorurii ferice.

Reactivi. — Soluţia de HCl-$FeCl_3$:

A. Soluţia de clorură ferică ($FeCl_3 . 6H_2O$) 10 g%;

B. Acid clorhidric conc.

Se amestecă în proporţie de 0,5 ml reactiv A la 100 ml reactiv B.

— Soluţie de orcinol 10% în etanol 96°. Deoarece soluţia nu este stabilă, se prepară extemporaneu.

Modul de lucru. Se amestecă 1 ml din probă (10—50 mg pentoză) cu 5 ml soluţie de HCl — $FeCl_3$ şi 0,4 ml soluţie de orcinol. Se introduce amestecul într-o baie marină la 80°C şi se ţine exact 3 min. Se răceşte proba în apă cu gheaţă în care se menţine pînă la fotometrare. Pentozele dau o culoare verde care se măsoară la 665 mμ. Se introduc extincţiile într-o curbă de etalonare construită de preferinţă cu pentoza care se dozează.

Precizări. Durata încălzirii trebuie riguros respectată pentru a face neglijabilă interferenţa hexozelor şi heptozelor (11). O soluţie de glucoză

Scanned with OKEN Scanner

0,1% nu dă coloraţie; o soluţie de fructoză 0,01% dă o extincţie care reprezintă numai 1/50 din extincţia unei soluţii de acid adenilic cu aceeaşi concentraţie.

Un timp de încălzire mai lung (32) se poate aplica numai amestecurilor care nu conţin hexoze.

Observaţii. În afara pentozelor, reacţia cu orcinol şi clorură ferică este dată de hexoze (culoare galbenă), sedoheptuloză (culoare brună), acidul sialic (culoare verde-violetă), acid hexuronic şi unele trioze. Intensitatea acestor reacţii este mult mai mică decît cea dată de pentoze, dacă se foloseşte un timp de încălzire de numai 3 min. De aceea, în prezenţa unor cantităţi moderate din aceste substanţe, pentozele se pot determina cu o precizie satisfăcătoare.

În unele cazuri, pentru eliminarea interferenţelor, se pot folosi citirile dicromatice. Astfel, pentru eliminarea interferenţei produsă de glucoză, se determină lungimea de undă pentru care absorbţia dată de glucoză este identică cu aceea de la 665 mμ. În mod obişnuit această lungime de undă este în jur de 580 mμ pentru glucoză. Diferenţa $E_{665}m\mu - E_{580}m\mu$ este o măsură a concentraţiei pentozelor, deoarece ecuaţia are valoarea zero pentru glucoză.

Metoda cu antronă pentru hexoze (44) (43)

Principiul. Reacţia de culoare este bazată pe formarea derivaţilor furfuralului şi pe condensarea lor cu antrona.

Reactivi. Se dizolvă 2 g antronă în 1 litru H_2SO_4 conc. p.a., liber de azot. Reactivul se poate păstra un timp limitat la frigider. Stabilitatea antronei comerciale în acid sulfuric variază considerabil de la produs la produs.

Modul de lucru. Se pipetează 10 ml reactiv de antronă într-o eprubetă cufundată într-o baie de apă de 10—15°C. Se adaugă încet deasupra reactivului 5 ml din proba analizată şi se lasă un timp să se răcească. Se amestecă apoi conţinutul eprubetei, avînd grijă ca în acest timp eprubeta să rămînă imersată în baia de apă rece. Se scoate proba la temperatura camerei şi se introduce într-o baie marină la fierbere, timp de 16 min. Se dezvoltă o culoare albastră. Se răceşte amestecul de reacţia şi se citeşte la 625 mμ. Curbele etalon se construiesc de obicei cu glucoză.

Observaţii. Intensitatea culorii produsă de glucoză şi fructoză este aproximativ egală. Galactoza dă numai 54% din culoarea glucozei. Reacţia cu pentozele este mult mai puţin sensibilă şi are maximul de absorbţie la 600 mμ. Acizii nucleici nu reacţionează decît foarte slab şi numai la concentraţii mari. Acidul ascorbic dă o culoare roşie, triptofanul se colorează în roşu-portocaliu, iar acidul glutamic şi gelatina dau o culoare albastră. Acidul levulinic, acetolul, metilglioxalul şi polialcoolii nu interferă reacţia. Prezenţa clorurii de sodiu dă extincţii mai mari, de aceea în aceste cazuri trebuie folosit un standard intern.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia cu antronă este pozitivă, fără hidroliză prealabilă cu polizaharidele compuse din hexoze ca : glicogenul, celuloza, dextrine, dextranul, polizaharidele plantelor, polizaharidele pneumococului tip II şi III etc.

Metoda Elson-Morgan modificată pentru hexozamine (4) (41)

Principiul. Hexozaminele nu produc cantităţi semnificative de derivaţi furanici prin încălzire în acizi concentraţi. De aceea, metoda de determinare presupune realizarea unui inel oxazolic sau pirolic prin acetilarea hexozaminei şi tratamentul cu alcalii şi formarea unui derivat colorat prin cuplarea lui cu p-dimetilaminobenzaldehidă (reactivul Erlich).

La dozarea hexozaminei legate în polizaharide sau în glicoproteine sau a acetilhexozaminei libere şi legate trebuie efectuată o hidroliză prealabilă.

Reactivi. Acid clorhidric concentrat (8—12 N).

—Soluţie alcalină de acetilacetonă :

A. Acetilacetonă, soluţia trebuie să fie incoloră ; în caz contrar, se distilează şi se prinde fracţiunea de 138°C ;

B. Soluţie carbonat de sodiu 0,5 N.

Se amestecă 1 ml din reactivul A cu 50 ml din reactivul B. Soluţia se prepară extemporaneu.

— Etanol absolut liber de aldehidă.

— Reactivul Erlich. Se dizolvă 0,8 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 30 ml etanol absolut şi se adaugă 30 ml HCl concentrat. Soluţia se păstrează doar cîteva zile la rece.

Modul de lucru. Se introduc într-o eprubetă de sticlă termorezistentă 1—3 ml din soluţia polizaharidului analizat (10—100 μg hexozamină). Se adaugă un volum de acid clorhidric conc. astfel ales ca în amestec să se realizeze o concentraţie optimă care să producă o eliberare maximă de hexozamină. De obicei se realizează concentraţii de 2—4 N HCl, în funcţie de natura materialului analizat. Se astupă eprubeta şi se plasează într-o baie de apă adusă la fierbere.

Durata hidrolizei depinde de concentraţia acidului clorhidric şi de natura polizaharidului. Pentru proteinele serice cu o concentraţie de acid clorhidric 3 N, hidroliza durează 4 ore (54). Pentru antigenele de grup ale hematiilor, hidroliza durează numai 2 ore la o concentraţie de acid clorhidric 2 N (25). Desfacerea grupărilor acetil din hexozaminele acetilate libere se realizează mai uşor, doar într-o oră, în acid clorhidric 2 N (10).

Se răceşte eprubeta şi conţinutul se neutralizează cu o soluţie de NaOH de aceeaşi normalitate ca acidul clorhidric folosit la hidroliză ; se aduce apoi cu apă exact la 10 ml. Deoarece reacţia de condensare cu acetilacetonă este influenţată de pH, neutralizarea trebuie făcută riguros exact. De obicei se adaugă o picătură dintr-o soluţie alcoolică 0,5% fenolftaleină şi se adaugă apoi NaOH pînă la un viraj slab roz.

Scanned with OKEN Scanner

Din soluţia neutralizată se ia o parte alicotă de 1 ml şi se adaugă peste ea 1 ml din reactivul de acetilacetonă. Se amestecă conţinutul prin rotirea eprubetei, se astupă şi se imersează într-o baie de apă la fierbere. După 30 min se răceşte eprubeta la temperatura camerei, se adaugă 3 ml etanol absolut, se amestecă şi se introduce apoi, sub agitare, 1 ml reactiv Erlich. Amestecul se aduce la 10 ml cu etanol absolut. Se astupă şi se scutură puternic conţinutul eprubetei. Citirile se fac după 30 min la 540 mμ.

Cantităţile de hexozamină se calculează după o curbă etalon construită cu glucozamină hidroclorică.

Precizări. Neutralizarea hidrolizatului poate fi înlocuită prin evaporarea lui la sec. Se foloseşte un exsicator de vid care conţine în două vase separate granule de NaOH şi P_2O_5. Uscarea se face în vid sub o presiune de 1 ml coloană de mercur. Reziduul uscat se dizolvă în 10 ml apă.

Observaţii. Culoarea dezvoltată de către glucozamină şi galactozamină are un maxim de absorbţie identic şi o intensitate egală pentru cantităţi egale de glucid. Extincţiile sînt liniare pînă la concentraţii de 0,25 mg.

Celelalte aminozaharuri reacţionează într-o măsură mai mică (manozamina) sau mai mare (xilozamina). N-acetilglucozamina nehidrolizată poate da o reacţie de culoare care reprezintă 1/3 din intensitatea culorii dată de glucoză. Acizii uronici şi metilpentozele nu interferează reacţia decît la concentraţii mari, care nu se întîlnesc în ţesuturi. Aminoacizii singuri nu perturbă reacţia, dar, dacă sînt prezente glucoza şi fructoza se produce o culoare roşie care împiedică determinările.

Eliminarea substanţelor care perturbă reacţia se poate realiza prin cromatografierea hidrolizatului acid peste Dowex-50 (5).

O metodă mai sensibilă şi care este afectată mai puţin de impurităţile prezente în preparatele polizaharidice, este reacţia cu indol-HCl (3). Ea dă însă valori care nu sînt totdeauna în concordanţă cu cele obţinute prin metoda Elson-Morgan (7) (24).

Analizarea precipitatelor imune. Conţinutul în hexozamine al antigenelor polizaharidice precipitate printr-o reacţie imună se determină astfel (52): în eprubetele de centrifugă în care se găsesc precipitatele imune spălate se adugă 0,2 ml HCl conc. După dizolvare, se aduce HCl la concentraţia 2 N, adăugînd 1 ml apă distilată. Se astupă eprubetele şi se hidrolizează la fierbere 2 ore. În continuare, operaţiile se efectuează conform modului de lucru indicat mai sus.

Este necesar să se corecteze datele, scăzînd coloraţia dată de hexozaminele legate de anticorpii precipitaţi. Corecţia se face măsurînd coloraţia dată de 1 mg N γ-globulină sau anticorp şi calculînd coloraţia care revine cantităţii de N din anticorpul prezent în precipitatul imun (3).

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie

1. Ardry R., Ann. Biol. Clin., 1960, **17**, 214.
2. Ashwell G., în Colowick S. P. a. Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 1957, **III**, 73.
3. Beiser S. M. a. Kabat E. A., J. Amm. Chem. Soc., 1951, **73**, 3 501.
4. Belcher R., Nutten A. J. a. Sambrook C. M., Analyst, 1954, 79, 201.
5. Boas N. F., J. Biol. Chem., 1953, **204**, 553.
6. Chow S. C. a. Goldstein A., Biochem. J., 1960, **75**, 109.
7. Dische Z., J. Biol. Chem., 1949, **181**, 379.
8. — J. Biol. Chem., 1953, **204**, 983.
9. — în Glick D., *Methods in biochemical analysis*, Intersci. Publ., New York, 1955, **II**, 313.
10. Dische Z. a. Borentfreund E., J. Biol. Chem., 1950, **184**, 517.
11. Dische Z. a. Schwarz K., Mikrochimica Acta, 1937, **2**, 13.
12. Dutta S. K., Indian J. med. Res., 1958, **46**, 299.
13. Dzialoszynski L. M., *Colorimetric microdetermination of protein*, IV Internat. Congress. Biochem., Viena, 1958, 199.
14. Eggstein M. a. Kaeutz F. H., Klin. Wschr., 1955, **33**, 879.
15. Ellman G. L., Analyt. Biochem., 1962, **3**, 40.
16. Fels G. a. Veatch R., Analyt. Chem., 1959, **31**, 451.
17. Gheţie V. u. Buzilă L., Rev. Chim., 1961, **6**, 143.
18. Gitlin D., J. Immunol., 1949, **62**, 437.
19. Glasser D. u. Kleine R., Pharmazie, 1962, **17**, 32.
20. Glick D., Good R. S., Greenberg L. J., Eddy J. J. a. Day N. K., Science, 1958, **128**, 1625.
21. Gornall A. G., Bardawill C. S. a David M. M. J. Biol. Chem., 1949, **177**, 755.
22. Grabar P., în Loiseleur J., *Technique de laboratoire*, Masson, Paris, 1954, **I**, 829.
23. Grassmann W. u. Hannig K., Klin. Wochschr., 1954, **32**, 838.
24. Howe C. a. Kabat E. A., Arch. Biochem. Biophys., 1956, **60**, 244.
25. Kabat E. A., Bendich A. a. Bezer A. E., J. Exp. Med., 1946, **83**, 477.
26. Kirk P. L., Adv. Prot. Chem., 1947, **3**, 139.
27. — Analyt. Chem., 1950, **22**, 354.
28. Lang C. A., Analyt. Chem., 1958, **30**, 1962.
29. Layne E., în Colowick S. P. a. Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 1957, **III**, 447.
30. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. A. a. Randall R. J., J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265.
31. Markham R., Biochem, J., 1942, **36**, 790.
32. Mejbaum W., Z. Physiol. Chem., 1939, **258**, 117.
33. Mezincescu M. D. şi Cristea E., Revista de chimie, 1956, **7**, 697.
34. Miller G. L., Analyt. Chem., 1959, **31**, 964.
35. Murphy S. B. a. Kies M. W., Biochem. Biophys. Acta, 1960, **45**, 382.
36. Nayyar S. N. a. Glick D., J. Histochem. Cytochem., 1954, **2**, 282.
37. Peters T. Jr., J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1181.
38. — J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1186.
39. Popa L., St. şi cerc. biochim., 1961, **4**, 123.

Scanned with OKEN Scanner

ANTICORPUL

CAPITOLUL AL V-LEA. NOŢIUNI TEORETICE

Introducerea antigenului în organismul animalelor vertebrate determină elaborarea unor substanţe proteice specifice, numite anticorpi. Anticorpii apar în sînge la cîteva zile după injectarea antigenului şi pot fi puşi în evidenţă datorită capacităţilor de a se uni cu antigenul corespunzător. Un animal care a produs anticorpi în urma injectării repetate a antigenului, se consideră imunizat, iar procedeul prin care se provoacă formarea anticorpilor este denumit imunizare. Uneori, în acelaşi scop, se folosesc şi termenii : animal hiperimunizat şi hiperimunizare. Serul sanguin al animalelor imunizate este numit ser imun (hiperimun) sau, pe scurt, antiser. De exemplu, serul sanguin obţinut de la un iepure imunizat cu ovalbumină se numeşte ser imun (hiperimun) de iepure, antiovalbumină sau antiser de iepure faţă de ovalbumină.

Anticorpii aparţin familiei γ-globulinelor serice, fiind alcătuiţi din trei clase principale de proteine : γG sau IgG, γM sau IgM şi γA sau IgA (115). Simbolul *Ig* prescurtează termenul de imunoglobulină sub care sînt cuprinse toate proteinele dotate cu activitate de anticorpi.

Principalele proprietăţi ale imunoglobulinelor sînt înfăţişate în tabelul nr. 15.

Diferenţa dintre anticorpi şi γ-globulinele corespunzătoare constă în capacitatea celor dintîi de a se combina cu antigenul care a servit la imunizare. Anticorpii conţin pe suprafaţa lor două zone de combinare (*combining sites*) cu care se ataşează de grupările determinante ale antigenului. Fiecare zonă de combinare are o mărime corespunzătoare la 3—5 aminoacizi. Deoarece într-o moleculă de anticorp există aproximativ 1 400 de aminoacizi, rezultă că fiecare zonă de combinare cuprinde numai o porţiune mică din suprafaţa moleculei, cam de ordinul 1%. Deşi particularitatea structurală a anticorpilor este restrînsă numai la o mică parte din molecula lor, totuşi între anticorpii şi γ-globulinele normale ale aceluiaşi animal există diferenţe caracteristice în compoziţia aminoacizilor din care sînt constituiţi (57) (41) (6). Deci, în zona de combinare a anticorpilor există fie aminocizi specifici, fie o secvenţă caracteristică a aminoacizilor răspunzătoare pentru combinarea lor cu antigenul.

I. STRUCTURA ANTICORPILOR

Molecula anticorpilor este alcătuită din patru lanţuri polipeptidice legate între ele prin punţi disulfidice. Reducerea chimică a legăturilor disulfidice permite izolarea a două feluri de lanţuri polipeptidice : unul

Scanned with OKEN Scanner

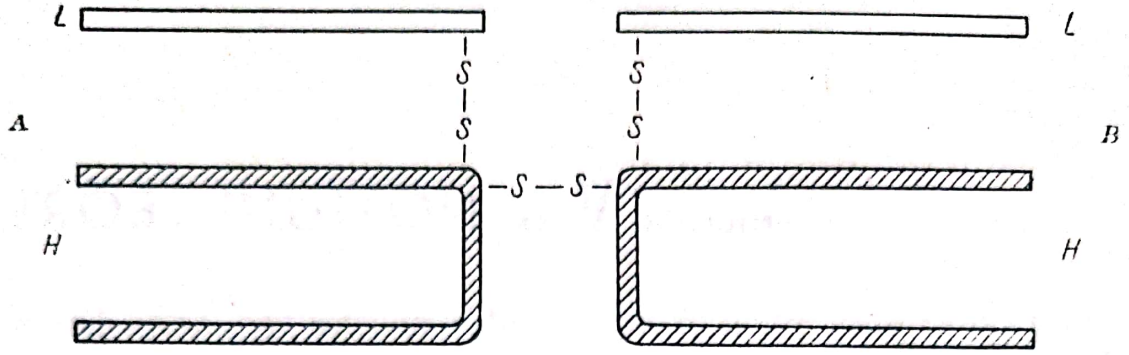


Fig. 45. — Structura tetrapolipeptidică a moleculei de anticorp;
A, B, zonă de combinare.

cu greutatea moleculară mare (55 000) notat cu H (heavy = greu) și celălalt cu o greutate moleculară considerabil mai mică (20 000) notat cu L (light = ușor). Cercetări efectuate pînă în prezent par a sugera că molecula anticorpilor este tetrapolipeptidică, fiind alcătuită din două lanțuri H și două lanțuri L (18) (29) (fig. 45). Fiecare lanț este legat de celălalt prin intermediul unei singure legături disulfidice (72).

Aranjarea topologică a lanțurilor polipeptidice într-un model spațial care să corespundă cu dimensiunile găsite pentru γ-globulina intactă și pentru lanțul L este redată mai jos (fig. 46).

Acest model presupune că lanțurile polipeptidice sînt pliate mai mult sau mai puțin compact în interiorul unui cilindru cu un volum de $2.10^5 Å^3$. Zonele de combinare sînt plasate la capetele cilindrului și au fost desenate ca o tăietură cuprinsă între lanțurile L și H. Participarea ambelor lanțuri polipeptidice la alcătuirea zonei de combinare a anticorpilor corespunde unor date din literatură (38) (69) (83), cu toate că participarea exclusivă a lanțurilor H (37) (53) sau L (28) (82) nu este exclusă.

Lanțurile H determină proprietățile caracteristice fiecărei clase de γ-globulină. Astfel, lanțurile H din γG-globulină diferă prin compoziția lor în aminoacizi de lanțurile H din γM-globulină și aceasta din urmă diferă de lanțurile H din γA-globulină. Corespunzător acestei situații, lanțurile H se notează cu simbolul γ pentru γG-globulină, μ pentru γM-globulină și α pentru γA- globulină. Se observă că simbolul γ se folosește fie pentru a desemna clasa γG de imunoglobuline, fie pentru a defini lanțul polipeptidic γ care alcătuiește molecula γG-globulinelor.

Lanțurile L sînt identice la toate cele trei clase de γ-globuline și constituie numitorul comun care înrudește aceste proteine. Fiecare clasă de γ-globulină umană conține două feluri de lanțuri ușoare, notate λ și ϰ. Din această cauză, fiecare clasă de γ-globuline este alcătuită din două tipuri principale : tipul L (care conține lanțul λ) și tipul K (care conține lanțul ϰ)[1].

[1] În publicațiile mai vechi, tipul L este desemnat și prin simbolurile II, 2, A, iar tipul K prin simbolurile I, 1 sau B.

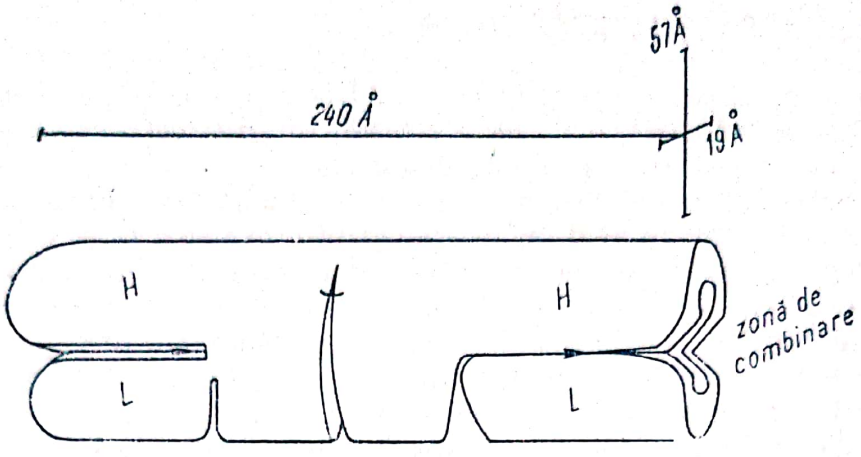


Fig. 46. — Un model spaţial pentru molecula anticorpilor din clasa γG-globulinelor (după G. M. Edelman şi colab., 1964).

Compoziţia polipeptidică a celor trei clase principale de anticorpi poate fi scrisă în următoarele formule moleculare :

Clasa	*Tipul*	*Compoziţia polipeptidică*
γG	γGL	$\gamma_2\lambda_2$
	γGK	$\gamma_2\varkappa_2$
γM	γML	$(\mu_2\lambda_2)_n^1$
	γMK	$(\mu_2\varkappa_2)_n$
γA	γAL	$\alpha_2\lambda_2$
	γAK	$\alpha_2\varkappa_2$

TABELUL NR. 15

Ctteva date asupra imunoglobulinelor de om

Clasa * / Date	γG	γM	γA
Constanta de sedimentare	6,6S	18—19S	7—15S
Greutatea moleculară	150 000	1 000 000	150—500 000
Mobilitate electroforetică	zona γ-lentă	zona γ-rapidă	zona β-γ
Conţinutul în glucide	3%	12%	10%
Procent relativ	70—85%	5—10%	5—25%
Termeni sinonimi	γ_2, 7S, γ_{ss}	γ_1M, 19S, β_2M	γ_1A, β_2A

* A patra clasă de γ-globulină umană, γD, este încă insuficient caracterizată (32) (84) (85), reprezentînd doar 1% din γ-globulinele totale.

[1] *n* poate fi egal cu 6.

Scanned with OKEN Scanner

II. ETEROGENITATEA ANTICORPILOR

Eterogenitatea anticorpilor se manifestă cel puţin la trei nivele:

a) Eterogenitatea de clasă, datorită distribuţiei anticorpilor între cele trei clase diferite de γ -globuline normale.

b) Eterogenitatea intramoleculară care se manifestă în cadrul fiecărei clase şi este cauzată de variaţii în structura lanţurilor H şi L.

c) Eterogenitatea zonelor de combinare rezultată din conformaţia variabilă a acestor zone. Aceste variaţii determină eterogenitatea unei populaţii de anticorpi, investită cu aceeaşi specificitate.

Cele trei clase de anticorpi diferă între ele prin proprietăţile lor fizico-chimice şi imunochimice (vezi tabelul nr. 15), prin comportarea lor metabolică (17) şi prin dinamica apariţiei lor ca răspuns la administrarea antigenului (vezi paragraful IV).

În cadrul fiecărei clase de γ-globulină umană există o populaţie moleculară eterogenă, care poate fi împărţită în două tipuri distincte, după natura lanţului L prezent în moleculă (31) (vezi formulele moleculare de la paragraful precedent). O moleculă dată aparţine sau tipului L sau tipului K însă niciodată ambelor tipuri. Eterogenitatea în sînul claselor de imunoglobuline este determinată şi de diferenţele de ordin genetic care există între indivizii aparţinînd aceleiaşi specii şi care se reflectă în structura primară a γ-globulinelor (81).

Anticorpii pot prezenta şi o eterogenitate legată de capacitatea lor de combinare cu antigenul corespunzător. Sub acest aspect, anticorpii prezintă două feluri de eterogenitate (30) (80) în raport cu gradul de adaptare al zonei de combinare faţă de acelaşi determinant antigenic şi în raport cu numărul de grupări determinante existente pe un antigen dat.

Anticorpii dirijaţi faţă de aceeaşi grupare determinantă pot să-şi varieze considerabil capacitatea lor de a se adapta la aceste grupări. Variaţia se manifestă prin aceea că forţa de combinare dintre antigen şi anticorp (aviditatea) variază mult în rîndul unei populaţii de anticorpi cu o specificitate dată. Aviditatea diferită a anticorpilor este determinată de configuraţia şi de dimensiunile diferite ale zonelor de combinare (50) (62). Astfel, anticorpii antidextran au putut fi separaţi, pe criteriul mărimii zonelor de combinare, în două populaţii diferite (91), iar anticorpii antihaptenici au prezentat variaţii însemnate în forţa de legare faţă de haptena corespondentă, prezentînd o eterogenitate marcată (55) (56).

Eterogenitatea zonelor de combinare variază cu mersul hiperimunizării animalelor, anticorpii de la sfîrşitul perioadei de imunizare avînd o aviditate crescută faţă de antigenul corespunzător (dacă schema de imunizare a fost corectă). Această comportare se datoreşte faptului că anticorpii devin din ce în ce mai bine adaptaţi la diferite grupări determinante, pe măsură ce imunizarea se prelungeşte.

Un antigen purificat, alcătuit numai din molecule de acelaşi fel, poate conţine mai multe grupări determinante distincte în molecula sa. Corespunzător acestei situaţii, antiserul va conţine tot atîtea categorii distincte de anticorpi cîte grupări determinante posedă antigenul. Albu-

Scanned with OKEN Scanner

mina umană conţine două sau mai multe grupări determinante, care sînt distribuite în diferite regiuni ale moleculei. De aceea, prin injectarea albuminei se obţin mai multe categorii de anticorpi care pot fi diferenţiaţi pe baza capacităţii lor de a reacţiona cu fragmente diferite ale moleculei de albumină (59) (108). Dacă un antigen posedă în moleculă două grupări determinante distincte, A şi B, se pot forma două categorii de anticorpi anti-A şi anti-B însă nu şi anticorpi anti-AB, capabili să reacţioneze cu ambele grupări determinante (71). Absenţa anticorpilor cu o dublă specificitate poate fi considertă ca o dovadă că pe o moleculă de anticorp cele două zone de combinare sînt întotdeauna dirijate faţă de aceeaşi grupare determinantă.

Eterogenitatea anticorpilor determinată de gradul diferit de adaptare al zonelor de combinare poate fi confundată cu cea cauzată de existenţa unui număr diferit de grupări determinante, distincte în molecula antigenului. Astfel, eterogenitatea unui anticorp antihaptenă poate reflecta nu numai gradul diferit de adaptare al zonelor sale de combinare, ci şi faptul că haptena se fixează în regiuni diferite ale proteinei purtătoare şi determină o eterogenitate antigenică (un număr diferit de grupări determinante) (93).

III. LOCUL DE FORMARE A ANTICORPILOR

Introducerea antigenului în organism pe cale intravenoasă este urmată în primele zile de o scădere bruscă a concentraţiei acestuia, datorită pătrunderii lui în lichidul interstiţial. După o scurtă perioadă de echilibrare, concentraţia antigenului scade din nou datorită formării anticorpilor. Eliminarea antigenului din circulaţie se face datorită formării complexelor antigen-anticorp, depozitate în celulele organismului. Dacă antigenele sînt injectate la animalele deja imunizate, ele sînt eliminate din circulaţie şi metabolizate mult mai repede decît la animalele neimunizate. Dispariţia rapidă a antigenului în aceste cazuri poate fi pusă pe seama combinării materialului injectat cu anticorpii circulanţi şi cei intracelulari.

Repartizarea antigenului în ţesuturi depinde de calea de injectare folosită. Cînd antigenul este injectat intravenos, cea mai mare cantitate se acumulează în splină şi măduva osoasă (98). Dacă se injectează local (intramuscular sau subcutanat), antigenele apar în ganglionii limfatici din regiunea respectivă a corpului (66). Aceste zone de acumulare a antigenului sînt totodată şi zonele care produc anticorpi. În aceste zone, antigenul este înglobat de celulele macrofage prin fagocitoză sau pinocitoză şi apoi degradat enzimatic cu concursul lizozomilor (110). Cu cît un antigen este mai curînd înglobat şi digerat de macrofage, cu atît el se dovedeşte a fi un antigen mai bun. Materialul antigenic asociat cu lizozomii are capacitatea de a produce o cantitate mai mare de anticorpi decît antigenul iniţial (107) (39). Degradarea antigenului se opreşte la nivelul unor fragmente moleculare care conţin grupările determinante specifice. Se pare că ma-

Scanned with OKEN Scanner

crofagele nu au capacitatea de a produce anticorpi; ele transmit limfocitelor fie fragmentele de antigen legate de un acid ribonucleic (ARN) specific, fie numai acidul ribonucleic singur (36) (15). Limfocitul începe să se mărească, nucleul şi citoplasma avînd aspectul caracteristic unei diviziuni celulare intense. Astfel are loc transformarea limfocitelor în celule plasmatice producătoare de anticorpi.

Nici macrofagele şi nici celulele ganglionilor limfatici nu sînt capabile să sintetizeze anticorpi dacă sînt expuse pe rînd la acţiunea antigenului *in vitro*. Incubate însă împreună ele formează anticorpi în prezenţa antigenului. S-a arătat că dacă macrofagele sînt expuse la acţiunea antigenului şi apoi se extrage ARN-ul, acesta, aparent liber de proteină, poate să determine *in vitro* formarea anticorpilor în celulele ganglionilor limfatici.

De asemenea, celulele din splina şoarecilor neimunizaţi au fost convertite în celulele formatoare de anticorpi cu ajutorul unui ARN extras din splina animalelor imunizate (19). În prezent nu există certitudinea că ARN-ul prin care se transmite informaţia antigenică este liber de orice urmă de material antigenic. Dimpotrivă, s-a arătat că ARN-ul extras din macrofage (1) sau din splină (88) este legat cu anumită cantitate de material antigenic. De aceea, nu se poate afirma că în celulele producătoare de anticorpi sinteza acestora este indusă de un ARN de tip mesager, format în macrofage sub influenţa antigenului. Tot aşa de bine se poate susţine că antigenul participă direct la formarea anticorpilor specifici (76).

Anticorpii se sintetizează activ în celulele plasmatice în curs de maturizare sau mature, la nivelul ribozomilor. Aceştia pot sintetiza proteina, fie izolaţi, fie sub formă agregată, alcătuită din 2—6 ribozomi (polizomi). Agregatele ribozomiale diferă de polizomii care au fost găsiţi în alte sisteme de sinteză proteică, prin aceea că sînt rezistenţi la atac cu ribonuclează şi sînt susceptibili la acţiunea enzimelor proteolitice (63). ARN-ul mesager din celulele limfoide are o stabilitate mult mai mare decît cel al celulelor bacteriene (60) şi este capabil să inducă sinteza proteică pe ribozomii nespecifici de *E. coli* (61). Fiecare celulă plasmatică care produce anticorpi sau γ-globuline sintetizează o singură clasă de imunoglobuline. Celulele care conţin γG-globuline reprezintă majoritatea; la rîndul lor celulele care sintetizează γM sînt în cazuri normale mai numeroase decît cele ce sintetizează γA. Există celule plasmatice care nu sintetizează imunoglobuline şi un număr foarte mic de celule care sintetizează chiar două clase deodată (67) (95) (10). Celulele plasmatice sînt în general capabile să producă un anticorp numai cu o singură specificitate. Totuşi, imunizînd animale cu două antigene deodată, se pot evidenţia un număr oarecare de celule care produc ambele feluri de anticorpi (73) (2). Aceste celule dau însă o reacţie puternică faţă de un antigen şi mult mai slabă faţă de celălalt.

Scanned with OKEN Scanner

IV. HIPERIMUNIZAREA ŞI DINAMICA FORMĂRII ANTICORPILOR

La animalele injectate cu o singură doză de antigen, cantitatea de anticorpi formaţi atinge maximul la 10—12 zile de la inoculare şi apoi scade treptat; la 4—5 săptămîni, anticorpii dispar din sîngele animalelor injectate (fig. 47). Nu întotdeauna se întîlneşte acest tip de curbă. Aspectul ei poate diferi considerabil în funcţie de natura antigenului şi de specia animalului folosit.

Dacă după dispariţia anticorpilor din circulaţie se reinjectează o doză mică din acelaşi antigen, se constată formarea rapidă a unei cantităţi de anticorpi mult mai mare decît după prima injecţie. Cantitatea de anticorpi atinge un maximum la 5—7 zile de la a doua injecţie şi apoi scade foarte încet; chiar la cîteva luni, anticorpii mai pot fi decelaţi în sîngele animalelor imunizate (23). Hiperimunizarea animalelor se realizează prin injecţii repetate de cîteva ori, deoarece concentraţia anticorpilor nu ajunge şi nu rămîne de obicei la un nivel ridicat, fără inoculări periodice. Durata imunizării nu trebuie totuşi prelungită prea mult, deoarece, în ciuda continuării injectărilor, concentraţia anticorpilor începe să scadă. Este fenomenul de oboseală imunologică a organismului.

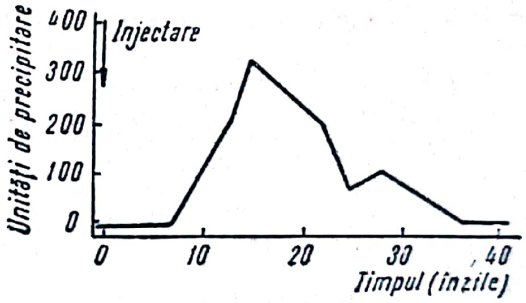


Fig. 47. — Variaţia concentraţiei anticorpilor în sîngele unui iepure injectat cu ser de cal (după G. S. Wilson şi colab., 1955).

Reacţia imunologică a organismului după prima injecţie este cunoscută sub denumirea de răspuns primar. A doua injecţie declanşează răspunsul secundar, denumit şi reacţie anamnestică. Răspunsul secundar este specific şi poate fi declanşat numai de antigenul cu care s-a provocat răspunsul primar sau de un alt antigen cu o structură apropiată. Injectarea unui antigen la un animal imunizat în prealabil cu un alt antigen înrudit determină o producere anamnestică de anticorpi faţă de primul antigen injectat. Astfel, iepurii injectaţi cu albumină serică de bou prezintă o creştere a concentraţiei anticorpilor antialbumină serică bovină chiar prin adminstrarea albuminei serice de cal în cea de-a doua injecţie. Deci, răspunsul secundar creşte cantitatea de anticorpi circulanţi capabili să reacţioneze cu primul antigen injectat (109).

Răspunsurile primar şi secundar pot fi deosebite prin sensibilitatea lor diferită faţă de razele X. Răspunsul primar al iepurilor poate fi complet inhibat prin iradierea totală a animalelor înainte cu 12—48 de ore de injectare a antigenului (22). Dacă iradierea se face după administrarea antigenului, formarea anticorpilor nu este împiedicată. Pe baza acestei sensibilităţi faţă de radiaţia X, răspunsul primar poate fi împărţit în două faze: faza inductivă, radiosensibilă, şi faza productivă, radiore-

Scanned with OKEN Scanner

zistentă (97). Faza inductivă este definită ca perioada după prima injecţie în care anticorpii nu pot fi detectaţi nici în ser şi nici în extractele ţesuturilor producătoare de anticorpi. Faza productivă, caracterizată prin apariţia anticorpilor, nu poate fi inhibată prin iradiere; răspunsul secundar nu este radiosensibil.

Organismul este capabil să răspundă la injectarea simultană a mai multor antigene diferite. Dacă numărul antigenelor este prea mare, formarea de anticorpi va fi mai mică pentru fiecare antigen în parte decît dacă acesta s-ar introduce singur. Doze foarte mari de antigen administrate animalelor adulte determină inhibarea formării anticorpilor. Este fenomenul de paralizie imunologică.

Producerea anticorpilor, atît după stimulul primar, cît şi după cel secundar, prezintă diferenţe în raport cu natura chimică a antigenului folosit. Dependenţa este înfăţişată în tabelul nr. 16.

TABELUL NR. 16

Natura chimică a antigenului şi dinamica formării anticorpilor.

Anticorpi	Antigen	
	proteină	polizaharid
1. *Răspuns primar*		
Apariţie	zilele 6—9	săptămînile 2—6
Acumulare maximă	timpurie	lunile 1—2
Scădere	rapidă apoi lentă	lentă
2. *Răspuns secundar*		
Creştere	zilele 3—4	slabă sau lipseşte
Scădere	mijlocie	lentă
3. Raportul dintre răspunsul secundar şi cel primar	10 :1	1 :10

Tipurile de anticorpi produşi în cursul răspunsului primar şi secundar diferă unul de celălalt, atît în ce priveşte greutatea lor moleculară, cît şi capacitatea lor de legare a antigenului (72). În majoritatea cazurilor, anticorpii formaţi în răspunsul primar aparţin clasei γM-globulinelor, iar în răspunsul secundar se formează cu precădere γG-globuline. Această regulă nu este generală. Înlocuirea anticorpilor γM cu γG se petrece şi după o singură injecţie (în cursul răspunsului primar) şi, în anumite condiţii, anticorpii γM se pot menţine şi în cursul răspunsului secundar. Tipul de anticorp care se formează în răspunsul secundar depinde de doza de antigen administrată (100) (11). Deoarece cantităţi mari de antigen favorizează menţinerea sintezei anticorpilor γM, se consideră că sinteza acestui fel de anticorp necesită prezenţa nemijlocită a antigenului (107) (106). Introducerea antigenului sub o formă corpusculară favorizează de asemenea producerea anticorpilor cu greutate moleculară mare (γM.) Astfel, fixarea tiroglobulinei pe răşini acrilice creşte titrul anticorpilor γM de 10—20 de

Scanned with OKEN Scanner

ori, fără modificarea titrului anticorpilor γG (104). Abilitatea antigenului legat de a stimula producerea anticorpilor γM se poate datora prelungirii persistenţei sale în macrofage ca rezultat al asocierii lor cu particule inerte sau datorită pinocitozei crescute. Starea de agregare a antigenului poate determina şi ordinea apariţiei celor două tipuri de anticorpi. Flagelina monomerică determină secvenţa γG—γM, în timp ce forma ei polimerizată provoacă secvenţa obţinută γM—γG (74).

În prezent nu se poate spune cu certitudine dacă anticorpii γM şi γG sînt formaţi de linii de celule diferite sau sînt formaţi consecutiv de aceleaşi celule. S-a arătat doar că majoritatea celulelor plasmatice pot sintetiza fie γM, fie γG-globuline şi numai un număr redus de celule sînt capabile să sintetizeze ambele clase de γ-globuline (68) (75). Anticorpii γG influenţează nefavorabil sinteza anticorpilor γM. Faptul că momentul sintezei masive de anticorpi γG coincide cu micşorarea proporţională a sintezei anticorpilor γM (54), coroborat cu constatarea că administrarea pasivă a anticorpilor γG inhibă sinteza γM-globulinelor (89), a condus la concluzia că anticorpii γG au o funcţie regulatoare, controlînd ritmul sintezei anticorpilor γM (70).

Sinteza anticorpilor poate fi suprimată selectiv cu ajutorul unor antimetaboliţi. Astfel, 6-mercaptopurina şi alte substanţe (12) (90) produc o inhibare a sintezei anticorpilor γG, lăsînd neschimbată sinteza anticorpilor γM. Hipervitaminoza A sau iradierea determină de asemenea prelungirea sintezei anticorpilor γM şi în răspunsul secundar. Acest efect poate fi pus pe seama lezării lizozomilor prin hipervitaminoză sau iradiere cu raze X şi preturbării catabolizării antigenului (110).

V. FACTORI CARE INFLUENŢEAZĂ BIOSINTEZA ANTICORPILOR

Capacitatea animalelor de laborator de a forma anticorpi depinde de specia, vîrsta, sexul, alimentaţia lor, cît şi de temperatura mediului ambiant.

Reactivitatea imunologică diferă de la specie la specie. Astfel, injectînd polizaharidul pneumococic la iepure (3) şi cobai (65) nu se constată apariţia anticorpilor, în timp ce la om (45) şi şoarece (3) producerea anticorpilor este considerabilă.

Animalele foarte tinere nu pot forma anticorpi, deoarece sistemul lor imunologic nu este maturizat (14). Contactul antigenului cu animalele în viaţa embrionară sau scurt timp după naştere (8—10 zile) (26) blochează capacitatea ulterioară a organismelor de a mai forma anticorpi faţă de antigenul dat. Este fenomenul de toleranţă imunologică (42). Reactivitatea imunlogică este de asemenea scăzută la animalele bătrîne (87).

Alimentaţia deficientă în proteine poate cauza, la unele specii de animale, scăderea sintezei de anticorpi (16). Aceste rezultate nu pot fi generalizate nici asupra tuturor antigenilor şi nici asupra altor specii (114) (5). Formarea anticorpilor este de asemenea redusă la animalele suferind

Scanned with OKEN Scanner

de o carență în riboflavină (111) (99), piridoxină (99) (4), acid folic (111), acid pantotenic (99) și, poate, vitaminele A și D.

Nivelul concentrației anticorpilor circulanți este dependent și de temperatura mediului ambiant, chiar la animalele homeoterme. Astfel, șoarecii ținuți la 35°C și imunizați cu anatoxină tetanică produc o cantitate mai mare de anticorpi decît cei ținuți la temperaturi mai joase (25°C sau 5°C) (47). Animalele poikiloterme (broaștele), imunizate la temperaturi de 8—10°C, prezintă o cantitate mică de anticorpi în sînge. La 20—23°C, nivelul anticorpilor umorali este mult mai ridicat (105). La ambele temperaturi se formează anticorpi celulari, însă secreția lor în circulație este posibilă numai la temperaturi mai ridicate (58).

1. Stimularea formării anticorpilor

Stimularea formării anticorpilor poate fi realizată prin adjuvanți, substanțe care se administrează animalelor în amestec cu antigenul. Sînt folosiți cu precădere doi adjuvanți: sărurile de aluminiu (79) și emulsiile soluțiilor apoase de antigen în ulei, cu sau fără adaos de micobacterii omorîte (adjuvant Freund) (40). Sărurile de aluminiu influențează asupra răspunsului imunologic primar, stimulind multiplicarea celulelor imunologic competente. Antigenul precipitat cu săruri de aluminiu formează un „depozit" din care antigenul este eliberat treptat. Cu cît eliberarea este mai lentă, cu atît crește numărul celulelor producătoare de anticorpi. Introducerea antigenului înglobat în ulei mineral determină întîrzierea eliminării și distrugerii locale a antigenului și ușurează dispersarea lui. Bacilii tuberculoși, care pot fi adăugați la adjuvant, au o acțiune stimulantă datorită unui component cu structură peptido-glicolipidică. Pe lîngă creșterea nivelului concentrației anticorpilor circulanți, corpii microbieni determină și o schimbare a calității acestor anticorpi (112) (fig. 50).

2. Inhibarea formării anticorpilor (51)

Inhibarea formării anticorpilor poate surveni prin folosirea radiațiilor X, a cortizonului sau a antimetaboliților.

Razele X inhibă formarea anticorpilor mai ales dacă se aplică cu 12—48 de ore înainte de injectarea antigenului. Faza inductivă, în care antigenul este fixat de celulele formatoare de anticorpi, este sensibilă la iradiere. Faza productivă primară sau secundară nu este influențată de iradiere (22). Capacitatea de producere a anticorpilor poate fi restaurată prin administrarea de colchicină (102) (46). Acțiunea razelor X poate fi explicată prin inhibarea formării celulelor producătoare de anticorpi.

Cortizonul, hormon eliberat de suprarenale, este capabil să împiedice reacțiile imunologice de apărare ale organismului, prin reducerea sintezei anticorpilor. Acțiunea cortizonului este similară cu cea a razelor X (8) (9). Producerea anticorpilor poate fi considerabil scăzută administrînd animalelor cortizon cu cel puțin 48 de ore înainte de injectarea antigenului.

Scanned with OKEN Scanner

Cortizonul administrat după imunizare este ineficace. Acest hormon acţionează asupra ţesutului limfoid, blocînd formarea precursorilor celulelor producătoare de anticorpi. Celulele plasmatice mature şi imature sînt, probabil, rezistente la tratamentul cu cortizon.

Acţiunea antagoniştilor metabolici, 6- mercaptopurina, 6-tioguanina etc., se exercită asupra sintezei acizilor nucleici care participă la formarea anticorpilor. S-a constatat că aceşti antimetaboliţi, administraţi fie înainte de imunizare (7) (98), fie după 2 zile de la imunizare (7) (27), sînt capabili să inhibe formarea anticorpilor. Sinteza anticorpilor poate fi inhibată *in vivo* prin actinomicina B (115), cunoscută ca blocînd sinteza ARN-ului mesager (20).

3. Paralizia imunologică

Dacă şoarecii sînt injectaţi cu mai mult de 0,5 mg polizaharid pneumococic, apare o stare denumită paralizie imunologică (33). Timp de cîteva luni animalele nu mai pot produce anticorpi prin reinjectarea antigenului. O paralizie similară poate fi indusă la iepuri prin administrarea unei cantităţi mari de proteine (21). În unele cazuri, paralizia poate fi determinată şi de cantităţi mici de proteină (25). Durata paraliziei imunologice creşte cu cantitatea de antigen injectată (94). Paralizia imunologică este specifică, formarea anticorpilor faţă de alte antigene nefiind afectată. Fenomenul poate fi cauzat de persistenţa antigenului în ţesut şi de capacitatea lui de a neutraliza şi îndepărta imediat din circulaţ ieanticorpii formaţi (24).

VI. MECANISMUL FORMĂRII ANTICORPILOR (35)

Biosinteza anticorpilor are loc printr-un mecanism încă insuficient elucidat, asupra lui existînd mai multe teorii.

Teoria matriţei a fost fundamentată de către Breinl şi Haurowitz (43) şi dezvoltată apoi în diferite variante de Pauling (77), Marrack (64) şi Karush (52). Toţi aceşti autori susţin că antigenul sau produşii săi activi de hidroliză intervin în procesul normal de formare a γ-globulinei influenţînd sinteza ei. Anticorpii ar reprezenta deci γ-globuline modificate sub influenţa directă a antigenului introdus în organism. Modificările pot să afecteze numărul şi secvenţa aminoacizilor (103) sau numai aşezarea în spaţiu a lanţurilor polipeptidice (77). Antigenul sau fragmentele de hidroliză ajung la nivelul polizomilor. Aici se stabilesc forţe intermoleculare între grupările determinate ale antigenului şi lanţul polipeptidic pe cale de formare. Aceste forţe ar putea determina îndepărtarea acelor aminoacil-ARN care nu permit lanţului polipeptidic să se plieze complimentar peste matriţa antigenică, şi înlocuirea lor cu cei aminoacil-ARN care permit lanţului polipeptidic să formeze zona de combinare specifică (44). Astfel, secvenţa aminoacizilor dictată de ARN-ul mesager se schimbă în acea parte a moleculei care se combină specific cu determinantul antigenic.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenul poate acţiona asupra sintezei anticorpilor şi prin intermediul nucleoproteinelor (92) (96), formînd o treaptă intermediară care reglează ulterior proteosinteza specifică (83)

Toate teoriile care acceptă participarea directă sau indirectă a antigenului la formarea anticorpilor se sprijină pe presupunerea că antigenul determină specificitatea moleculelor de proteină care se formează şi care, firește, nu au existat în organism înainte de administrarea antigenului.

Există şi teorii asupra mecanismului de formare a anticorpilor, care presupun că antigenul introdus în organism nu determină o proteosinteză specifică. Conform acestei concepţii, antigenul nu este decît un factor de selecţie a anticorpilor, sau a celulelor producătoare de anticorpi, care există în mod natural în organism.

Teoria lui J e r n e (48) presupune că în organism există o multitudine de molecule de γ-globuline dintre care unele prezintă proprietatea naturală de a reacţiona cu fiecare antigen la care organismul poate să răspundă. Aceste γ-globuline au fost numite anticorpi naturali şi ele pot fi detectate în organismul animalelor neimunizate (49). Antigenul injectat se combină cu γ-globulina, care are o structură complimentară. Complexul antigen — anticorp este transportat şi legat de celule. Prezenţa anticorpului respectiv în celule este un semnal numai pentru sinteza sau reproducerea moleculelor identice. Astfel se formează anticorpii specifici. Deci antigenul măreşte doar cantitatea de anticorpi formaţi de organism.

Teoria selecţiei clonale formulată independent de B u r n e t şi T a l m a g e (13) (103) presupune că selecţia are loc mai curînd între celulele formatoare de anticorpi decît între γ-globulinele serice extracelulare. Conform acestei teorii, fiecare antigen introdus în organism se combină numai cu celulele care conţin anticorpi naturali faţă de o grupare determinantă a antigenului administrat. Celulele activate în acest fel încep să se înmulţească în ţesuturi şi formează colonii de celule care produc acelaşi tip de anticorpi. Această teorie presupune şi faptul că în organism există celule care sînt destinate genetic numai pentru producerea anticorpilor de un singur tip şi care transmit această însuşire celulelor-fiice. Baza experimentală a acestui punct de vedere o constituie lucrările care au dovedit că o celulă formează numai un singur tip de anticorpi (73). În prezent se încearcă găsirea unei baze biochimice ferme pentru această teorie (101). (34).

Bibliografie

1. Askonas B. A. a. Rhodes J. M., Nature, 1965, **205**, 470.
2. Attardi G., Cohn M., Horibata K. a. Lennox E. S., J. Immunol., 1964, **92**, 335.
3. Avery D. T. a. Goebel N. J., J. Exp. Med., 1933, **58**, 730.
4. Axelrod A. E., Carter B. B., McCoy R. H. a. Geidinger R., Proc., Soc. Exptl., Biol. Med., 1947, **66**, 137.
5. Balch H. H., J. Immunol., 1950, **64**, 397.
6. Basset E. M., Tanenbaum S. W., Pryzwansky K., Beister S. M. a. Kabat E. A., J. Exp. Med., 1965, **122**, 251.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL VI-LEA. PREPARAREA ANTISERURILOR

ANTISERURILE se prepară prin hiperimunizarea animalelor de laborator cu materialul antigenic care urmează a fi supus analizei imunochimice.

Antiserul este un reactiv biologic cu o înaltă specificitate, indispensabil analizei imunochimice. Calitatea unui antiser se judecă în funcţie de cantitatea de anticorpi pe care îi conţine, precum şi de aviditatea şi specificitatea lor. Aviditatea indică afinitatea anticorpului pentru antigenul folosit la imunizare şi determină viteza de reacţie şi soliditatea combinaţiei dintre aceste două componente. Specificitatea exprimă capacitatea anticorpilor de a reacţiona numai cu antigenul folosit la imunizare (antigenul omolog). Există şi unele excepţii, denumite reacţii încrucişate, în care anticorpul poate să reacţioneze şi cu substanţe care au o structură asemănătoare cu antigenul omolog. Un antiser va fi considerat cu atît mai specific cu cît capacitatea sa de reacţie va fi limitată doar la antigenul folosit la imunizare sau la un număr cît mai mic de antigene înrudite. Unele detalii structurale pot să nu se reflecte specific în antiser. Astfel, antigenele pe care s-au grefat grupări determinante cu o structură chimică diferită, $-C_6H_4-Cl$ şi $-C_6H_4-CH_3$, sînt echivalente imunologic, dînd naştere unui singur fel de anticorpi.

Obţinerea antiserurilor cu un conţinut ridicat în anticorpi, înzestraţi cu o mare afinitate pentru antigenul omolog şi cu o înaltă specificitate, depinde în mare măsură de modul în care se realizează hiperimunizarea animalelor de laborator. Elaborarea schemelor de hiperimunizare se face în raport cu următorii parametri: antigenicitatea materialului injectat, reactivitatea imunologică a animalelor folosite, dozele de antigen şi ritmul injectării lor, calea de inoculare şi durata imunizării.

Aceşti parametri influenţează cantitatea şi calitatea anticorpilor elaboraţi. Astfel, prin administrarea unei cantităţi necorespunzătoare de antigen sau dacă nu se ţine seama de raportul dintre antigenicitatea materialului inoculat şi reactivitatea imunologică a animalelor folosite, se obţin antiseruri cu o concentraţie scăzută în anticorpi. Antiserurile cu concentraţie în anticorpi scăzută nu pot sesiza modificările mai fine care pot avea loc la nivelul antigenului cercetat. În primele etape ale imunizării animalelor, aviditatea anticorpilor este mai ridicată decît spre sfîrşitul ei. Prelungirea duratei imunizării reduce considerabil şi specificitatea anticorpilor formaţi; totodată creşte intensitatea şi întinderea reacţiilor încrucişate. Schema de hiperimunizare se alcătuieşte întotdeauna în raport cu scopul cercetării.

Scanned with OKEN Scanner

Analiza imunochimică este cu atît mai eficace, cu cît antiserul utilizat reflectă mai fidel conţinutul antigenic al materialului injectat. Două animale, injectate cu acelaşi antigen, în aceleaşi condiţii, nu vor da decît rareori un răspuns imunologic identic. Cantitatea şi calitatea anticorpilor va fi diferită, deci şi posibilităţile lor de a surprinde modificări la nivelul antigenului omolog vor fi diferite. Este de la sine înţeles că neidentitatea răspunsului imunologic va fi şi mai netă dacă animalele folosite la imunizare nu aparţin aceleiaşi specii sau dacă se aplică scheme de hiperimunizare diferite. Folosind pentru fiecare schemă aplicată un număr suficient de animale, se poate stabili pentru antigenul studiat specia de animale şi schema de hiperimunizare care furnizează antiserul cel mai potrivit cu scopul analizei imunochimice întreprinse.

Marea variabilitate a răspunsului imunologic introduce în analiza imunochimică un reactiv care poate varia de la experimentator la experimentator şi care, fără îndoială, este responsabil de neconcordanţa unor rezultate obţinute în laboratoare diferite. Cum nu există o cale generală prin care să se obţină antiseruri standard pentru toate antigenele, prepararea antiserurilor continuă să fie realizată prin procedee particulare, elaborate în concordanţă cu scopul cercetării întreprinse. Pentru aplicarea lor corectă trebuie respectate cu multă stricteţe toate indicaţiile cu privire la hiperimunizarea animalelor, cuprinse în acest capitol. Prepararea antiserurilor este o operaţie complexă, care implică atît manipularea antigenelor, cît şi a animalelor.

Antigenele trebuie sterilizate înainte de inoculare, pentru a se evita infectarea animalelor. În unele cazuri, antigenele sterile sînt asociate cu adjuvanţi pentru stimularea răspunsului imunologic.

Alegerea animalelor este, în primul rînd, dictată de reactivitatea lor imunologică, în raport cu antigenul cercetat. Pentru nevoile analizei imunochimice curente, se poate folosi antiserul animalelor mici : iepuri, şobolani, cobai, şoareci şi păsări. Dacă există condiţii de întreţinere, pot fi folosite şi animale mari : oi, capre, cai etc. Aplicarea unei scheme de hiperimunizare implică cunoaşterea tehnicilor de inoculare a antigenului şi de recoltare a antiserurilor. Deoarece răspunsul imunologic al fiecărui animal este diferit, antiserurile corespunzătoare nu trebuie amestecate niciodată, ci se testează individual.

Parcurgerea corectă a acestor etape micşorează diferenţele dintre antiserurile de acelaşi fel şi asigură experienţelor o reproductibilitate satisfăcătoare.

I. STERILIZAREA ANTIGENELOR

În cursul multiplelor operaţii prin care se realizează izolarea şi purificarea antigenelor este foarte greu, dacă nu chiar imposibil, să se menţină sterilitatea preparatelor. Hiperimunizarea animalelor necesită totuşi un material antigenic aseptic, din două motive : *a*) evitarea unor

Scanned with OKEN Scanner

a antibioticelor asupra elaborării anticorpilor specifici se manifestă numai la administrarea unor cantităţi însemnate. Or, cantităţile de penicilină şi streptomicină adăugate la antigenul injectat sînt atît de mici, încît pare puţin probabil că ele ar putea influenţa sinteza anticorpilor. De remarcat faptul că la hiperimunizarea cobailor antigenul nu poate fi injectat în asociaţie cu penicilina şi streptomicina, deoarece acestea sînt toxice pentru animale.

Mai importantă este lămurirea acţiunii pe care o pot exercita antibioticele asupra constituţiei antigenice a materialului injectat. Este greu de prevăzut dacă antibioticele în concentraţiile indicate mai sus sînt capabile să modifice structura antigenică a substanţelor inoculate. Imunizînd loturi de animale cu antigene aseptice şi cu antigene conţinînd antibiotice, nu s-au obţinut niciodată rezultate care să sugereze modificarea structurii antigenice sub acţiunea penicilinei şi streptomicinei. Dacă acest mod de acţiune este deci mai puţin probabil, în schimb este posibilă legarea antibioticelor de substanţele proteice din amestec (1). În aceste condiţii, antibioticele pot să acţioneze ca haptene şi să determine apariţia anticorpilor corespunzători (100) (31). Deşi specificitatea răspunsului imunologic este astfel micşorată, totuşi prezenţa în antiser a anticorpilor faţă de antibiotice nu stînjeneşte analiza imunochimică.

II. ASOCIEREA ADJUVANŢILOR (62) (35)

Adjuvanţii introduşi în organism împreună cu antigenul sînt capabili să stimuleze sinteza anticorpilor specifici producînd creşterea nivelului anticorpilor circulanţi. Sînt folosite cu precădere două categorii de adjuvanţi :

a) Emulsii de apă în ulei, cu sau fără adaos de micobacterii (adjuvant Freund). Antigenul este dizolvat în faza apoasă.

b) Săruri de aluminiu, în special gelul de hidroxid de aluminiu. Antigenul este adsorbit de particulele gelului.

Stimularea formării anticorpilor poate fi realizată şi prin adsorbţia antigenelor pe alte substanţe ca agar, acid alginic, fosfatul de calciu, silicagel (83) etc. Includerea antigenului în gel de acrilamidă şi inocularea lui la animale sub această formă are, de asemenea, un efect adjuvant (89) (108). Această proprietate poate fi folosită la hiperimunizarea animalelor cu fracţiuni proteice separate prin electroforeză preparativă pe gel de poliacrilamidă, fără nici un fel de operaţii suplimentare (108).

Acţiunea imunologică a adjuvanţilor este în strînsă legătură cu natura chimică şi starea fizică a antigenului cu care sînt asociaţi. Din acest motiv, un adjuvant care stimulează energic răspunsul imunologic la un antigen oarecare poate fi complet ineficace în raport cu un alt antigen.

Adjuvanţii produc două efecte distincte : stimulează formarea anticorpilor şi prelungesc durata persistenţei lor în sînge. De aceea, în unele cazuri este nevoie doar de o singură injecţie de antigen amestecat cu un adjuvant oarecare pentru a se obţine instalarea unui răspuns imunologic

de lungă durată. Adăugarea adjuvantului permite scăderea cantităţii de antigen injectat şi micşorarea numărului de injecţii administrate, fără ca nivelul anticorpilor circulanţi să fie afectat.

Imunizările făcute în prezenţa adjuvanţilor dau rezultate uniforme şi reproductibile, datorită ştergerii diferenţelor individuale în reactivitatea imunologică a animalelor. În unele cazuri, adjuvanţii cresc stabilitatea antigenelor cu care sînt asociaţi. Acest efect nu este însă general; el diferă de la antigen la antigen şi de la adjuvant la adjuvant. Adjuvanţii au capacitatea de a transforma substanţele aparent neantigenice în substanţe cu acţiune antigenică efectivă. Analiza imunochimică se poate astfel extinde şi asupra substanţelor lipsite de proprietatea de a induce singure formarea anticorpilor sau asupra substanţelor slab antigenice.

Experimentatorul hotărăşte adăugarea adjuvanţilor la materialul antigenic de injectat, în funcţie de scopul pe care-l urmăreşte analiza imunochimică. Astfel, la injectarea unui preparat antigenic, care conţine alături de antigenul principal şi alte impurităţi antigenice, nu se recomandă folosirea adjuvantului dacă se urmăreşte obţinerea unui antiser care să reacţioneze numai cu antigenul principal. Dacă se urmăreşte obţinerea anticorpilor faţă de toate antigenele existente în preparat (chiar şi faţă de cele aflate în cantităţi mici), se va asocia întotdeauna un adjuvant, de preferinţă de tipul Freund.

1. Adjuvantul Freund (42) (38) (39) (40)

Compoziţie şi proprietăţi

Adjuvantul Freund nu este o substanţă omogenă, ci un amestec format din ulei mineral, emulgator şi micobacterii omorîte.

Amestecul adjuvant lipsit de micobacterii este cunoscut sub denumirea de adjuvant Freund incomplet.

Uleiul mineral recomandat este un ulei uşor de parafină (42). Astfel de uleiuri se găsesc în comerţ sub diferite denumiri, ca : Bayol (F,55), Drackeol (F, 6, 6VR), Atreol 9, Klearol etc. Sînt uleiuri înalt rafinate, libere de componenţi nesaturaţi, stabile şi lipsite de culoare, miros sau gust. Uleiurile minerale pot fi înlocuite efectiv cu hidrocarburi saturate cu lanţuri lungi, formate din 15-20 atomi de carbon (23).

Emulgatorul se adaugă uleiului mineral în scopul de a permite emulsionarea soluţiei apoase de antigen în uleiul mineral. Se folosesc ca emulgatori lanolina anhidră sau derivaţi de lanolină, cunoscuţi sub denumirea comercială de Aquaphor şi Falba. Ultimii au o capacitate mai mare de fixare decît lanolina, un volum de Aquaphor absorbind o cantitate de apă de 7—8 ori greutatea sa. Emulgatorii pe bază de lanolină pot fi înlocuiţi cu succes cu derivaţi proveniţi din monooleatul de manitol (Arlacel A şi C) (18) sau monooleatul de glicerol (Myverol).

Micobacteriile omorîte cele mai folosite sînt : *M. tuberculosis* de tip uman, aviar sau bovin, *M. butyricum*, *M. smegmatis*, *M. phlei* şi unele

Scanned with OKEN Scanner

specii de *Nocardia*. Bacilii se omoară în prealabil prin încălzire la 60°C timp de o oră şi apoi se usucă prin liofilizare.

Preparatele bacteriene integrale pot fi înlocuite prin diferite fracţiuni lipidice obţinute din micobacterii (64) (115).

Preparare

Asocierea adjuvantului Freund la soluţia apoasă de antigen se realizează prin emulsionarea fazei apoase care conţine antigenul în uleiul mineral.

Se pot utiliza două procedee principale pentru prepararea emulsiei :

Procedeul 1. Se amestecă uleiul de parafină (Bayol F) cu emulgatorul [1] (Arlacel A) în proporţie de 1,5 ml la 8,5 ml. Se suspendă micobacteriile omorîte (5 mg/ml) în soluţie apoasă de antigen sterilă sau conţinînd antibiotice. În acest scop, se mojarează micobacteriile omorîte, adăugîndu-li-se în porţiuni mici soluţie de antigen. Peste uleiul mineral conţinînd emulgatorul se adaugă, în porţiuni mici, amestecînd puternic şi continuu, un volum egal din soluţia de antigen conţinînd micobacteriile. Omogenizarea se realizează într-un mojar sau într-un omogenizator cu cuţite. Emulsia se desăvîrşeşte aspirînd de cîteva ori amestecul într-o seringă prevăzută cu un ac subţire.

Amestecul total trebuie să conţină 100 U. I. de penicilină şi 0,1 mg streptomicină la 1 ml. În lipsa antibioticelor toţi componenţii emulsiei trebuie sterilizaţi în prealabil, iar prepararea trebuie efectuată steril.

Procedeul 2. Soluţia apoasă de antigen se amestecă într-un mojar cu un volum egal de emulgator. Se suspendă micobacteriile omorîte şi mojarate în uleiul mineral (2,5 mg/ml).

Emulsia se realizează prin adăugarea amestecului de antigen şi emulgator la un volum egal de ulei mineral şi micobacterii. Omogenizarea se efectuează cu una din metodele indicate la procedeul descris anterior. Prepararea corectă a emulsiei, prin unul din cele două procedee, se controlează aşezînd o picătură de emulsie pe suprafaţa unei ape reci. Dacă prin agitarea apei, picătura nu se întinde pe suprafaţa acesteia, emulsia este corect preparată. Ea este stabilă cîteva zile la temperatura laboratorului. Cu toate acestea, emulsiile nu se prepară decît înainte de inoculare. Ele nu se injectează niciodată pe cale intravenoasă.

Mod de acţiune

Adjuvantul Freund este un amestec compus din mai multe substanţe, de aceea stabilirea modului său de acţiune implică cunoaşterea rolului pe care îl joacă în imunogeneză cele două componente principale : emulsia de apă în ulei şi micobacteriile.

Emulsia apoasă. Privită la microscop, emulsia apare sub forma unor picături apoase de diferite mărimi, care înglobează antigenul şi care sînt dispersate în ulei. Stabilitatea emulsiei este condiţionată de calitatea emul-

[1] Dacă se foloseşte lanolină, aceasta se lichefiază în prealabil prin încălzire pe baia de apă.

Scanned with OKEN Scanner

gatorului, care se dispune sub forma unui strat la limita de separare a celor două faze, partea hidrofilă unindu-se cu faza apoasă, iar partea hidrofobă legîndu-se cu uleiul (fig. 49).

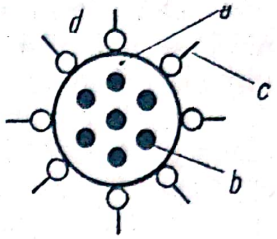


Fig. 49. — Structura emulsiei de apă în ulei. *a*, Faza apoasă; *b*, antigenul; *c*, emulgatorul; *d*, faza uleioasă (mediul de dispersie).

Pentru realizarea emulsiei de apă în ulei se aleg emulgatori pe bază de lanolină, care se dizolvă mai bine în ulei decît în apă. Dacă se folosesc emulgatori mai hidrofili (de ex. Tween 80), atunci se obțin emulsii de ulei în apă care nu au proprietăți adjuvante. Lipsa proprietăților adjuvante se explică prin absența învelișului uleios care, încetinind absorbția antigenului, stimulează formarea anticorpilor.

Uleiurile folosite sînt de origine minerală, deoarece cu ele se realizează emulsii mai stabile decît cu uleiurile vegetale. În plus, ele nu sînt degradate de enzimele din organism. Stabilitatea excesivă a emulsiei are însă un efect nefavorabil asupra imunogenezei, probabil datorită ritmului prea lent de eliberare a antigenului de la locul injectării (17).

Viscozitatea emulsiei depinde de viscozitatea uleiurilor minerale folosite. Efectul antigenic al unei emulsii poate fi crescut dacă se mărește viscozitatea emulsiei. Mărirea viscozității pînă la o valoare optimă a efectului adjuvant se realizează prin modificarea raportului dintre soluția apoasă de antigen, emulgator și ulei mineral. Emulsiile prea vîscoase sînt însă lipsite de acțiune adjuvantă (17).

Rezultă că o stabilitate și o viscozitate medie a emulsiei, realizată prin procedeele descrise mai sus, sînt cele mai indicate pentru obținerea unui efect adjuvant optim.

Efectul adjuvant al emulsiei de apă în ulei reiese clar din tabelul nr. 17.

TABELUL NR. 17

Titruri în anticorpi la șoareci după vaccinarea cu S.paradysenteriae fără adjuvant și într-o emulsie de ulei mineral (după S. P. Halbert și colab., 1946)

Modul de administrare a antigenului	Titrul în anticorpi (săptămîni)							
	1	2	6	10	12	14	18	22
Fără adjuvant	40	20	4	4	8	4	5	8
Cu adjuvant (emulsie de ulei mineral)	40	20	16	256	256	256	160	32

Administrarea antigenului în emulsie de apă în ulei mărește considerabil nu numai concentrația anticorpilor în sînge, ci și durata persistenței lor.

Emulsia de apă în ulei stimulează producerea anticorpilor prin două mecanisme :

a) Întîrzie distrugerea locală a antigenului şi eliminarea lui, acţionînd ca o barieră uleioasă protectoare împotriva enzimelor proteolitice din organism (56).

b) Uleiul mijloceşte dispersia antigenului, permiţînd eliberarea continuă a acestuia de la locul de introducere şi protejarea lui în drumul parcurs spre ţesuturile formatoare de anticorpi.

Inocularea antigenului în emulsie uleioasă provoacă o reacţie inflamatorie locală de forma unor chisturi bine individualizate, învelite într-un perete gros de ţesut fibros reactiv. În interiorul acestor chisturi, antigenele se păstrează un timp îndelungat. Antigenul *S. paradysenteriae* a fost găsit la locul de introducere chiar la 22 de săptămîni după inoculare. Îndepărtarea chistului la 14 zile de la injectarea antigenului nu produce scăderea titrului în anticorpi. Nici chiar îndepărtarea chistului la o jumătate de oră de la inoculare nu inhibă formarea anticorpilor, ci doar scade titrul acestora.

În ciuda reţinerii antigenelor la locul de inoculare, stimulul antigenic începe să se şteargă şi, cel puţin în cazul ovalbuminei, titrul scade considerabil după 4 săptămîni de la inoculare (37). Probabil că în prezenţa anticorpilor circulanţi din sînge şi limfă, antigenul nu mai poate străbate ţesutul fibros care înconjură chistul. Anticorpii circulanţi formează cu antigenul un precipitat imun, care acţionează ca o barieră în calea diseminării antigenului (109) (92).

Faza uleioasă are o persistenţă mare în organism; au fost evidenţiate picături uleioase asociate cu anticorpi în ganglionul limfatic cervical la cobai, după 3 săptămîni de la data inoculării antigenului (111) (70).

Micobacteriile. Întrebuinţarea sistematică la imunizare a bacililor tuberculoşi omorîţi prin căldură s-a făcut în urma observaţiei lui J. Freund şi colab. (41) că, adăugînd emulsiei apoase microbi tuberculoşi omorîţi, animalele produc anticorpi într-un titru considerabil mai mare decît animalele-martor, care au primit doar emulsia simplă de apă în ulei a antigenului.

Stimularea formării anticorpilor este realizată, pe lîngă bacilii tuberculoşi şi de M. butyricum, M. phlei, M. smegmatis, Nocardia asteroides şi N. brasiliensis. Acest fapt arată că efectul adjuvant este provocat de un constituent chimic comun acestor microorganisme, distribuit în cantităţi variabile la fiecare dintre speciile microbiene enumerate. Astfel, la formarea anticorpilor faţă de antigenul bacterian S. typhi, efectul M. butyricum este mai slab decît cel al M. tuberculosis, iar M. phlei are o acţiune mult mai slabă decît speciile citate (38).

Constituenţii chimici din celula microbiană, responsabili pentru efectul adjuvant, se găsesc în ceara bacilară care învelește la exterior celula (24) (85) (86). Ceara bacilară are un efect adjuvant asupra producerii anticorpilor faţă de antigenele solubile (de ex. ovalbumina), instalînd în acelaşi timp şi o stare de hipersensibilitate întîrziată, de tip tuberculinic, faţă de antigenul respectiv (87). Injectarea ovalbuminei sub formă de emulsie apă în ulei, împreună cu bacilii tuberculoşi omorîţi sau cu ceara bacilară

Scanned with OKEN Scanner

purificată, produce o creștere a cantității de anticorpi circulanți de cîteva ori mai mare decît prin injectarea antigenului într-o emulsie de apă în ulei (37) (111) (87) (tabelul nr. 18).

TABELUL NR. 18

Concentrația anticorpilor circulanți la cobaii imunizați cu 10 mg de ovalbumină cristalizată în emulsie apoasă, cu și fără adaos de ceară purificată; sîngerările s-au efectuat la 3 săptămîni de la inoculare (după R. G. Wite și colab., 1955)

Doza de ceară adăugată (în mg)	Nr. animalelor folosite	Titrul mediu în anticorpi (μg N anticorpi/ml)
0	10	40
0,04	3	175
0,2	5	349
1	2	193
5	5	332

Deoarece chiar ceara purificată obținută din bacilii tuberculoși este alcătuită din mai multe componente, ea s-a separat în mai multe fracțiuni lipidice (A, B, C și D) (112) și s-a cercetat participarea lor la stimularea formării anticorpilor. S-a constatat că fracțiunea D din bacili tuberculoși de tip uman posedă acțiune adjuvantă, în timp ce aceeași fracțiune obținută din bacili tuberculoși de tip bovin, aviar, *M. phlei* și *M. smegmatis* era inactivă (112) (113).

Hidroliza fracțiunii active D a pus în evidență trei componente principale (64) (115) (65):

a) Acid micolic, un β-hidroxiacid cu lanțuri ramificate, avînd formula brută $C_{88}H_{176}O_4$, găsit pînă în prezent numai în micobacterii. Acidul micolic reprezintă aproximativ 50% din cantitatea totală a fracțiunii D.

b) Un polizaharid care conține azot, cu greutatea moleculară cuprinsă între 6 000 și 9 000. Polizaharidul este alcătuit din arabinoză, galactoză și manoză, precum și din cantități mici de hexozamină (glucozamină, galactozamină și acid muramic).

c) Hexapeptide alcătuite din aminoacizii atît ai seriei naturale L, cît și ai seriei nenaturale D. Au fost semnalați acidul D-glutamic, D și L-alanină, acidul mezo-α, ε-diaminopimelic (10) și uneori glicocol.

Structura fracțiunii acide D pare să fie: acid micolic — polizaharid — hexapeptid. Acidul micolic este esterificat cu polizaharidul, iar de acesta sînt legate covalent 1—3 molecule de hexapeptid (109).

Spre deosebire de fracțiunea D provenită din bacilii tuberculoși umani, fracțiunile D inactive de altă origine nu conțin în structura lor aminoacizi, fiind formate numai din acid micolic și polizaharid. În lumina acestor rezultate, pare că efectul adjuvant al fracțiunii D este legat de prezența în moleculă a fragmentului peptidic. Activitatea imunologică a fracțiunii D este condiționată de păstrarea integrității sale structurale. Astfel, acidul micolic și fragmentul glicopeptidic inoculați separat nu au efect adjuvant (109).

Scanned with OKEN Scanner

Adăugarea peptidoglicolipidului extras din *M. tuberculosis* de tip uman la un antigen în emulsie de apă în ulei creşte nu numai nivelul anticorpilor circulanţi, dar schimbă în acelaşi timp şi calitatea lor (109) (114). Astfel, antiserul de cobai, obţinut la 3 săptămîni după injectarea ovalbuminei asociate cu peptidoglicolipidul sau corpii microbieni totali, prezintă la imunoelectroforeză două linii de precipitare în zona γ şi β_2-globulinelor, în timp ce antiserul animalelor imunizate fără adjuvant nu posedă decît o singură linie de precipitare plasată în zona β_2 (fig. 50).

În acest caz peptidoglicolipidul injectat la cobai determină apariţia în organele anticorpo-formatoare a unei populaţii noi de celule plasmatice, capabile să sintetizeze anticorpi caracteristici care alcătuiesc linia de precipitare din zona γ. Probabil că, sub influenţa adjuvantului, se declanşează şi sinteza anticorpilor antiovalbumină de tipul γ G (9).

Inocularea bacililor tuberculoşi omorîţi provoacă o serie de leziuni locale, limitate doar la punctul sau zona de introducere. Ganglionii corespunzători zonei injectate păstrează de cele mai multe ori un aspect normal, foarte rar semnalîndu-se o tumefacţie şi o uşoară hiperemie. Asocierea uleiului mineral la bacilii tuberculoşi omorîţi determină apariţia leziunilor locale şi distanţate. Injectarea amestecului de micobacterii omorîte şi ulei mineral în laba piciorului la cobai determină succesiv modificări macroscopice în ganglionul popliteal (în ziua a 4-a), inghinal (în ziua a 5-a) şi sublombar (în ziua a 14-a). Introducerea amestecului în muşchi determină modificări macroscopice în ganglionul sublombar deja în a 11-a zi de la inoculare. În unele cazuri, chiar plămînii pot prezenta mici granulaţii sticloase cu diametrul de 0,5 — 3 mm.

În primele zile ale modificărilor ganglionare se observă microscopic o hiperplazie limfoidă şi o dilatare a sinusurilor, care apar mai bogate în limfocite şi celule macrofage. Stimularea proliferării celulelor macrofage se observă nu numai în ganglionii limfatici, ci şi la locul inoculării şi uneori chiar în plămîni. Dezvoltarea continuă a sistemului reticuloendotelial producător de anticorpi este asigurată de prezenţa simultană a celor două componente, micobacteriile omorîte şi uleiul mineral. Începînd cu ziua a 10-a, modificările histologice sînt mai accentuate. Capsula ganglionară apare mult mai îngroşată, lamele fibroelastice fiind îmbrăcate cu noi straturi concentrice formate din celule fusiforme. În acelaşi timp apar mase conjunctive formate din celule stelate, iar parenchimul suferă importante modificări datorită prezenţei unor mari zone epitelioide presărate cu lacune.

La nivelul plămînilor, modificările histologice se caracterizează prin îngroşarea ţesutului pulmonar (îngroşarea tramei tisulare) şi apariţia unor noduli caracteristici, mai mult sau mai puţin delimitaţi, după gravitatea leziunilor. Ţesutul ganglionar şi pulmonar poate să revină spre aspectul său normal după o anumită perioadă de timp, în raport cu animalul folosit şi numărul de doze inoculate.

Modificările morfologice descrise mai sus relevă faptul că producţia efectivă de anticorpi are loc şi în zone depărtate de locul inoculării amestecului antigen—adjuvant. Stimularea imunogenezei depinde şi de afinitatea dintre antigen şi adjuvant. Existenţa unor grupări lipofile în molecula antigenului poate determina formarea unor legături puternice cu lipidele polare ale adjuvantului, ceea ce stimulează formarea anticorpilor. Astfel,

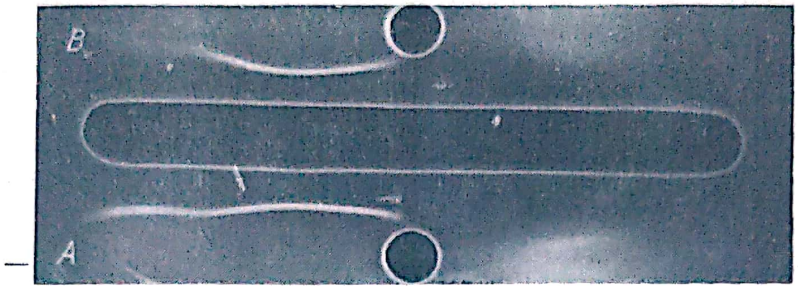


Fig. 50. — Imunoelectroforeza serului imun de cobai anti-ovalbumină recoltat de la animale injectate cu și fără adjuvant Freund.

A, serul imun obținut de la cobai imunizați cu ovalbumină în emulsie de apă în ulei conținînd peptidoglicolipidul din *M. tuberculosis* de tip uman; *B*, ser imun obținut de la cobai imunizați în mod similar însă fără adăugarea peptidoglicolipidului. În șanțul central s-a introdus o soluție de ovalbumină. (adaptată după R. G. White și colab., 1963).

asocierea adjuvantului Freund la virusurile lipofile (gripă, herpes etc.) stimulează imunogeneza, în timp ce ea este fără rezultat la virusurile hidrofile (poliomielită, coxsachie etc.) (80).

Dacă participarea micobacteriilor omorîte la stimularea formării anticorpilor este indiscutabilă, în schimb, mecanismul prin care se realizează acest efect este insuficient elucidat. Se pare că micobacteriile provoacă apariția unei populații noi de celule în splină, măduva oaselor și ganglionii limfatici din regiunea inoculată. Cum o parte din aceste celule au capacitatea de a sintetiza anticorpi, este evident că mărirea numărului lor are drept consecință și creșterea cantității de anticorpi sintetizați. Asocierea adjuvantului mărește numărul absolut al celulelor plasmatice din organele formatoare de anticorpi, însă nu și proporția lor. Astfel, injectînd un antigen cu sau fără adjuvant, s-a constatat că proporția celulelor plasmatice a rămas neschimbată : 3 % la apogeul răspunsului primar și 20-30 % la apogeul răspunsului secundar.

Creșterea numărului de celule formatoare de anticorpi se realizează prin hiperplazia și proliferarea sistemului reticulo-endotelial. Acest proces reactiv poate fi cauzat de tendința sistemului reticuloendotelial de a înlocui celulele distruse sau lezate prin acțiunea micobacteriilor omorîte. Totodată, este posibil ca în procesul de hiperplazie să fie implicați și precursorii celulelor plasmatice (109).

Influența pe care o exercită adjuvantul asupra sistemului celular anticorpo-formator este nespecifică și se poate manifesta, la șoareci, prin scurtarea perioadei răspunsului primar (79). Acest fapt, demonstrat prin administrarea adjuvantului înaintea inoculării antigenului, sugerează că activarea nespecifică a mecanismului imun se petrece în primele momente ale răspunsului primar, precedînd răspunsul imun specific față de antigenul dat (79).

Administrarea la cobai a adjuvantului înainte de injectarea antigenului determină, dimpotrivă, o scădere a reactivităţii imunologice (63). În acest caz, adjuvantul provoacă o lezare a aparatului imunologic şi animalele nu mai sînt capabile să răspundă adecvat la injectarea consecutivă a antigenului.

Intervalul dintre administrarea antigenului şi a adjuvantului joacă un rol important în stimularea sintezei anticorpilor. Astfel, injectarea lipopolizaharidului[1] cu 6 ore sau mai mult înainte de administrarea antigenului este fără nici un efect adjuvant, în timp ce administrarea lui la 24—72 de ore după antigen produce stimularea formării anticorpilor (69) (84).

Maturitatea imunologică a animalelor de experienţă joacă, de asemenea, un rol important la stimularea formării anticorpilor. Astfel, la iepurii nou-născuţi nu se constată formarea anticorpilor faţă de B r u c e l l a, chiar dacă se adaugă adjuvantul, ceea ce arată că, la animalele imature imunologic, nu se poate induce formarea anticorpilor nici chiar prin asocierea adjuvanţilor (84) (50).

În sfîrşit, trebuie semnalată o observaţie care mai aşteaptă încă confirmare, anume că *adjuvantul Freund complet nu are nici un efect adjuvant asupra antigenelor polizaharidice* (107).

Accidente

Datorită micobacteriilor omorîte, încorporate în adjuvantul Freund, utilizarea acestuia la imunizarea animalelor nu este lipsită de pericolul unor accidente.

Componentele proteice din bacilul tuberculos sînt capabile să producă o reacţie de hipersensibilitate întîrziată, atît la animalele tuberculoase, cît şi la cele sănătoase. Această reacţie, cunoscută şi sub denumirea de hipersensibilitate de tip tuberculinic, se manifestă cutanat, la 48—72 de ore de la inocularea micobacteriilor omorîte. Viteza cu care se induce hipersensibilitatea întîrziată, precum şi întinderea şi gravitatea răspunsului cutanat local variază de la o specie la alta. Omul, maimuţa şi cobaiul reacţionează violent la injectarea adjuvantului complet, formînd la locul inoculării abcese sterile, de aceea imunizarea lor nu trebuie efectuată cu adjuvant Freund. Celelalte animale folosite pentru producerea anticorpilor nu prezintă decît rar fenomene cutanate de gravitatea celor semnalate mai sus. În aceste cazuri, abcesele se tratează cu praf de sulfamidă sau cu streptomicină pentru a evita infectarea lor.

Apariţia stării de hipersensibilitate întîrziată nu este asociată cu prezenţa anticorpilor umorali (44). Accidentele cutanate datorită sensibilizării organismului la micobacterii trebuie deosebite de cele cauzate de prezenţa anticorpilor în sîngele şi ţesuturile animalelor imunizate. În ultimul

[1] Stimularea formării anticorpilor poate fi realizată şi prin lipopolizaharidele extrase din alte celule bacteriene decît micobacteriile (de ex. *Salmonella typhimurium*).

Scanned with OKEN Scanner

caz, reacţia cutanată este dependentă de formarea complexului imun antigen — anticorp şi se manifestă şi în absenţa adjuvantului Freund (fenomenul Arthus). În cursul hiperimunizării animalelor, fenomenul Arthus se poate produce mai frecvent decît reacţia tuberculinică, fiind prezentat de toate animalele capabile să formeze anticorpi faţă de antigenul injectat (v. p. 207).

În afara acestor accidente cutanate locale, care rămîn de multe ori fără un efect nociv general, adjuvantul Freund poate produce un accident grav atunci cînd se asociază la un antigen preparat din substanţă nervoasă. Injectarea repetată şi îndelungată a unei emulsii de ţesut cerebral în ulei mineral cu adaos de micobacterii produce la animalele de experienţă o encefalomielită alergică, manifestată prin ataxie, paralizia extremităţilor şi a vezicii urinare (88) (67) (76) (34). Apariţia acestor simptome poate fi cauzată de o reacţie inflamatorie la nivelul creierului. Această reacţie poate fi provocată, la rîndul ei, atît de o hipersensibilitate întîrziată faţă de antigenul administrat, cît şi de o reacţie imună între anticorpii anticreier care se formează şi antigenele din ţesutul cerebral al organismului receptorului. Ultima reacţie poate avea loc numai dacă există o înrudire antigenică între ţesutul cerebral injectat şi cel al receptorului (specificitate de organ). Astfel ţesutul cerebral de pasăre poate produce boala la maimuţe.

Bacilii tuberculoşi omorîţi sînt mai activi decît *M. butyricum* în ceea ce priveşte acţiunea lor encefalitogenă (51). Sub acest aspect, o activitate egală cu *M. tuberculosis* manifestă şi alte bacterii ca *S. typhosa*, *S. typhimurium* şi *E. coli* (52).

Starea fizică a emulsiilor de apă în ulei influenţează de asemenea producere encefalomielitei. Creşterea viscozităţii emulsiei apoase scade severitatea simptomelor encefalitogene (53).

În sfîrşit, pentru producerea encefalitei este necesară administrarea concomitentă a ţesutului cerebral şi a adjuvantului Freund complet. Injectarea lor separată nu determină apariţia simptomelor caracteristice. Materialele antigenice de origine nervoasă folosite la hiperimunizarea animalelor trebuie administrate ca atare sau în asociaţie cu adjuvant Freund incomplet. Durata imunizării nu trebuie să depăşească 60 de zile.

În afara encefalomielitei „alergice" pot surveni şi alte accidente prin administrarea antigenelor extrase din diferite ţesuturi omologe în asociaţie cu adjuvant Freund. Astfel, inocularea ţesutului tiroidian provoacă apariţia tiroiditelor (54), ţesutul renal declanşează glomerulonefrite (43), ţesutul testicular produce aspermatogeneză (106). Tiroiditele pot apărea la iepure, prin imunizare intensă cu tireoglobulină de cîine (119). Dimpotrivă, aspermatogeneza se produce numai la imunizare cu ţesut omolog nu şi cu cel eterolog (106).

Bolile declanşate în urma formării anticorpilor antiorgan, cu excepţia encefalitei, nu perturbă decît în cazuri rare efectuarea hiperimunizării, animalele de experienţă fiind capabile să producă antiseruri corespunzătoare.

Scanned with OKEN Scanner

2. Gelul de aluminiu

Compoziție și proprietăți

Hidroxidul de aluminiu, sarea cea mai întrebuințată în practica imunologică, este un coloid, obținut prin precipitarea unei soluții de sulfat de aluminiu sau de diferiți alauni cu o bază (hidroxidul de sodiu sau de amoniu) (105).

Se prezintă sub forma unui gel albicios, translucid, insolubil în apă. În gel moleculele sînt unite prin legături de hidrogen. Stabilitatea gelului scade cu timpul datorită cristalizării sale sub formă de hidrargilită. Stabilitatea depinde în mare măsură de sarcina electrică aflată la suprafața particulelor coloidale. La pH 8,1, hidroxidul de aluminiu se află la punctul său izolectric, avînd cel mai mare coeficient de precipitare. Hidroxidul de aluminiu și-a găsit aplicații în practica imunizărilor datorită calităților sale adsorbante. Antigenul se adsoarbe cu ușurință pe suprafața gelului și astfel este reținut timp îndelungat la locul de inoculare.

Preparare

Hidroxidul de aluminiu se prepară din soluția unui alaun $K\,Al\,(SO_4)_2$ sau $NH_4Al\,(SO_4)_2$ prin precipitare cu hidroxid de amoniu (metoda Willstäter) (117) sau hidroxid de sodiu (metoda Goret) (51) (47).

Se procedează astfel : 5 g alaun de potasiu se dizolvă în 52,5 ml apă distilată și se precipită cu o soluție de hidroxid de sodiu 33%, pînă la un pH în jur de 8,1 (sînt necesare aproape 3,8 ml hidroxid). Precipitatul format se centrifughează și se spală apoi de 4 ori cu apă distilată pentru eliminarea impurităților care micșorează capacitatea de adsorbție a gelului. După spălare precipitatul se reia într-un volum egal de apă distilată, se repartizează în vase și se sterilizează la autoclav (15 min la 110°C). Gelul astfel preparat conservă cel puțin două luni puterea sa adsorbantă.

Hidroxidul de aluminiu preparat este destul de impur. Impuritățile pot fi complet eliminate prelungind foarte mult durata spălărilor cu apă distilată. Spălarea pentru eliminarea electroliților durează 18—25 de zile. Operația se apropie de sfîrșit cînd lichidul supernatant de spălare devine tulbure și se limpezește greu. Din acest moment se lasă gelul încă 7 zile în repaus pentru ca lichidul să se separe prin sinereză. Se îndepărtează 2/3 din acest lichid, se ajustează gelul la anumite constante fizico-chimice și se sterilizează la autoclavă timp de 1 oră la 120°C. Gelul astfel preparat se păstrează la frigider (4°C) timp îndelungat fără a-și modifica sensibil proprietățile adsorbante.

Gelul de aluminiu este corect preparat dacă are următoarele constante fizico-chimice (47) :

a) reziduul uscat obținut prin calcinare între 1,5 și 1,7 g% fără a depăși 2 g% ; *b*) pH neutru ; *c*) capacitatea mare de absorbție ; 4 ml de gel amestecat cu 70 ml soluție roșu de Congo M-850 trebuie să adsoarbă aproape complet colorantul ; *d*) capacitate mare de imbibiție ; 4 ml gel amestecat cu 20 ml apă distilată trebuie să aibă după 48 de ore, un volum minim de 5 ml.

Scanned with OKEN Scanner

Gelul de hidroxid de aluminiu se amestecă volum la volum cu soluţia antigenului, sterilizată sau conţinînd antibiotice în concentraţie de 200 U. I. penicilină şi 0,2 mg streptomicină la 1 ml.

Amestecarea antigenului cu adjuvantul poate fi realizată şi pe altă cale (68) : la 100 ml soluţie sterilă de antigen (1,5 mg/ml proteină) se adaugă 5 ml dintr-o soluţie sterilă de alaun 1%. Se neutralizează pînă la turbiditate maximă cu o soluţie de hidroxid de sodiu N/10.

Spre deosebire de adjuvantul Freund, asocierea gelului de aluminiu permite administrarea intravenoasă a antigenelor.

Mod de acţiune

Efectul adjuvant al gelului de aluminiu se datoreşte adsorbţiei întîrziate a antigenului de la locul de injectare. Administrînd iepurilor albumină serică bovină marcată cu I^{131}, s-a constatat că radioactivitatea persistă mai mult dacă antigenul este administrat în asociaţie cu gel de aluminiu decît dacă se injectează în soluţie salină (99).

Eliberearea treptată şi întîrziată a antigenului a fost demonstrată prin urmărirea persistenţei depozitului de antigen la locul inoculării. Injectarea antigenului în amestec cu gel de aluminiu dă naştere la un granulom local, care constă dintr-o masă centrală de macrofage şi o zonă periferică alcătuită din limfocite şi celule plasmatice. S-a arătat că granuloame vechi de 7 săptămîni excizate, macerate şi inoculate la alte animale şi-au păstrat activitatea antigenică.

După injectarea subcutanată a ovalbuminei sau anatoxinei difterice în amestec cu fosfatul de aluminiu, prima producţie de anticorpi se constată în ganglionul limfatic regional, iar în granulomul local prezenţa anticorpilor se detectează numai 14 zile mai tîrziu (110). Celulele plasmatice, producătoare de anticorpi, sînt prezente în număr mare în regiunile periferice ale granulomului local, timp de 7 săptămîni. Această producţie locală de anticorpi contribuie, desigur, la creşterea nivelului anticorpilor umorali.

Efectul adjuvant al gelului de aluminiu se datoreşte întîrzierii absorbţiei antigenului de la locul injectării, ceea ce determină o prelungire a stimulării celulelor din ganglionii limfatici regionali şi din granulomul local. În acest fel, antigenul eliberat poate acţiona ca un stimul secundar.

Eliberarea treptată a antigenului depinde de cantitatea gelului folosit ca adjuvant, de pH-ul la care se efectuează asocierea proteinei cu gelul de aluminiu şi de natura chimică a proteinei folosite (60).

III. ALEGEREA ANIMALELOR

Pentru lucrările experimentale de imunochimie se folosesc în special animale mici de laborator ca : iepuri, cobai, şobolani, şoareci şi păsări (găini). Dintre acestea, cel mai utilizat este iepurele, animal dotat cu o

reactivitate imunologică uniformă în raport cu un număr mare de antigene şi capabil să furnizeze o cantitate de antiser suficientă pentru analiza imunochimică curentă. Întrebuinţarea celorlalate specii de animale citate mai sus, ca şi a altora (oaie, capră, măgar, cal etc.) este dictată de particularităţile cercetării imunochimice întreprinse, un rol important avînd proveniența antigenului.

Antigenele obţinute din diferite umori sau organe ale unui animal oarecare nu se analizează de obiceiu cu un antiser obţinut de la un animal aparţinînd aceleaşi specii. În aceste cazuri se alege un animal producător de anticorpi dintr-o specie cît mai depărtată de cea care furnizează antigenul. Folosirea animalelor cît mai îndepărtate taxonomic de animalul de la care s-a obţinut antigenul este o regulă cu destule excepţii. Astfel, serul imun de şobolan antişoarece este capabil să distingă mai bine deosebirile imunochimice la nivelul antigenelor de şoarece decît serul imun de iepure corespunzător. De asemenea, antiserurile faţă de izoantigene pot fi obţinute numai prin inocularea acestora la indivizi aparţinînd aceleiaşi specii, dar care nu posedă izoantigenul respectiv (55) (82).

Alegerea speciei cu cea mai mare reactivitate imunologică la antigenul studiat, controlul stării igienico-sanitare a animalelor, precum şi întreţinerea lor corectă pe toată durata hiperimunizării sînt condiţii care concurează la realizarea unui răspuns imun eficient şi uniform în sînul lotului de animale folosit.

Animalele care aparţin aceleiaşi rase, cu aceeaşi vîrstă şi greutate corporală, de acelaşi sex şi se bucură de acelaşi regim de întreţinere pot totuşi să prezinte variaţii individuale în concentraţia anticorpilor umorali formaţi ca răspuns la introducerea aceluiaşi antigen. Variaţiile sînt generate de reactivitatea imunologică diferită, determinată genetic pentru fiecare individ folosit. Din acest motiv, pentru obţinerea unui antiser faţă de un singur antigen, experimentatorul trebuie să hiperimunizeze un lot format din cel puţin 3 animale.

Răspunsul imunologic al fiecărui individ se manifestă printr-o cantitate şi calitate determinată a anticorpilor umorali. Răspunsurile individuale nu trebuie contopite într-o „valoare medie" a întregului lot folosit, mai ales atunci cînd antiserurile servesc la analiza structurii imunochimice a antigenului. De aceea, antiserurile obţinute de la mai multe animale nu trebuie niciodată folosite sub formă amestecată, iar rezultatele obţinute cu fiecare ser imun în parte vor trebui analizate separat.

1. Reactivitatea imunologică a animalelor

Alegerea animaleleor pentru hiperimunizare se face în raport cu natura chimică a antigenului şi cu sursa materialului biologic din care a fost obţinut. De aceea, în absenţa datelor din literatură, experimentatorul trebuie să stabilească, în funcţie de antigenul studiat, specia de animale care produce cantitatea cea mai mare de anticorpi precipitanţi. Iepurele

Scanned with OKEN Scanner

şi găina sînt animale bune producătoare de anticorpi precipitanţi, şobolanul şi şoarecele produc anticopi precipitanţi în concentraţii medii, iar cobaiul este, de multe ori, slab producător de anticorpi precipitanţi, deşi el este capabil să producă însemnate cantităţi de anticorpi neutralizanţi. La alegerea speciei trebuie urmărită capacitatea animalelor, atît de a sintetiza anticorpi, cît şi de a menţine constant nivelul lor în sînge, un timp îndelungat. În felul acesta, sîngele animalelor poate fi folosit o perioadă lungă ca sursă de anticorpi.

Producerea anticorpilor şi nivelul concentraţiei lor în sînge depinde de capacitatea organismului de a fixa antigenul inoculat. Nereuşita imunizării pisicilor cu antigene proteice este legată de eliminarea lor rapidă din organism, rinichiul fiind permeabil pentru aceste macromolecule (4). Toxina difterică nu este reţinută în organismul şobolanului. De aceea, injectarea unor doze moderate nu provoacă formarea anticorpilor dar nici nu îmbolnăveşte animalul, toxina eliminîndu-se prin urină.

După ce experimentatorul s-a oprit asupra speciei de animale pe care urmează s-o folosească, el trebuie să se îngrijească ca toţi indivizii care compun loturile să aparţină aceleiaşi rase. Astfel, se pot folosi iepuri de Chinchilla cu blana gri-argintie, cobai de Olanda, cu partea anterioară a corpului de culoare albă, şoareci şi şobolani albi, găini Rhode-Island de culoare roşie-vişinie etc. În unele cazuri se pot folosi şi linii de animale (şoareci sau şobolani) selecţionate prin consangvinizare (*inbreding*). Folosirea loturilor compuse din animale de aceeaşi rasă sau din linii pure asigură un răspuns imunologic mai uniform.

Răspunsul imunologic variază şi cu vîrsta. De aceea, pe cît posibil, loturile trebuie alcătuite din animale de aceeaşi vîrstă. Vîrsta animalului are o mare importanţă asupra producţiei de anticorpi. Astfel, şoarecii de 2 luni produc mult mai puţini anticorpi decît cei de 4—5 luni (36). Iepurii adulţi (6—13 luni, 1,6—3,0 kg) formează cu mare uşurinţă anticorpi, în timp ce după aceeaşi excitaţie antigenică la animalele tinere (6 săptămîni, 0,5—0,75 kg) şi bătrîne (peste 2 ani, 3,0—5,0 kg) cantitatea de anticorpi este considerabil mai mică (12). În funcţie de vîrstă, variază şi calitatea anticorpilor, exprimată prin viteza reacţiei dintre anticorpi şi antigenul respectiv (aviditate). Iepurii adulţi prezintă serurile imune cu cea mai mare aviditate (12) (13). Reactivitatea imunologică mai scăzută a animalelor tinere se explică prin imaturarea sistemului imunologic producător de anticorpi. O reactivitate şi mai scăzută există în viaţa embrionară, cînd majoritatea animalelor nu sînt capabile să sintetizeze anticorpi. Vîrsta maturării imunologice variază de la o specie la alta, existînd animale cu o maturare precoce şi altele cu o maturare tardivă. De aceea, pentru hiperimunizare vor fi folosite întotdeauna animale adulte.

În sfîrşit, reactivitatea imunologică a animalelor variază şi cu temperatura mediului ambiant (57). Această dependenţă este frapantă la vertebratele cu sînge rece, la care nivelul anticorpilor umorali este puternic influenţat de temperatura mediului (v.p.167). La homeoterme, sinteza anticorpilor este de asemenea scăzută la o temperatură prea joasă. De aceea,

Scanned with OKEN Scanner

prin hiperimunizarea animalelor în anotimpul friguros (decembrie—februarie) se vor obţine antiseruri cu un titru în anticorpi mai scăzut.

Criteriul reactivităţii imunologice după care se face alegerea animalelor trebuie întotdeauna confruntat cu cantitatea de antiser necesară analizei imunochimice întreprinse. Pentru cantităţi de antiser de ordinul mililitrilor sau fracţiunilor de mililitru se pot folosi şoarecii şi şobolanii, pentru cantităţi de ordinul zecilor de mililitri trebuie recurs la iepuri sau găini; iar cîteva sute de mililitri de antiser pot fi obţinuţi numai de la animale mari. Cantităţi importante de anticorpi pot fi obţinute chiar şi de la şoareci, dacă se practică injectarea intraperitoneală a antigenului în asociaţie cu adjuvant Freund. Adjuvantul induce formarea unei cantităţi mari de lichid de ascită (10—15 ml), care este tot atît de bogat în anticorpi ca şi antiserul respectiv şi care poate fi utilizat cu succes în analiza imunochimică (8). Folosirea lichidului de ascită are avantajul că permite recoltarea lui periodică, pe măsură ce se acumulează în abdomen.

2. Controlul animalelor (32) (30)

Determinarea stării de sănătate

La recepţia animalelor se vor examina, în primul rînd, perii lor. Animalele sănătoase au părul moale şi lucios; el se desprinde greu de pe suprafaţa pielii. Animalele bolnave au părul zburlit, fără luciu, relativ aspru la pipăit şi cade cu uşurinţă. La păsările sănătoase, penajul trebuie să fie uniform şi lucios, creasta roşie etc.

Se examinează apoi cavităţile nazale. Dacă animalele strănută, îşi freacă des botul de labele anterioare sau prezintă unele secreţii sero-mucoase, ele vor fi îndepărtate. Se va urmări dacă animalele n-au abdomenul mărit sau dacă nu au diaree.

Starea sănătăţii se poate aprecia şi după comportarea animalului. Animalul bolnav se mişcă greoi, ţine capul într-o parte, are coloana vertebrală curbată şi nu reacţionează la zgomote.

În sfîrşit, starea de sănătate se controlează prin măsurarea temperaturii animalelor. Termometrul, în prealabil dezinfectat, se introduce în rect. Temperatura normală rectală a iepurilor este de 38°,5—39°,5 C; a cobailor 37°,3—39°,2 C; a şobolanilor 36°,6—39°,3 C; a şoarecilor 36°—37°,4 C şi a păsărilor 40°—42°,5 C.

Animalele bolnave vor fi imediat izolate şi cuştile dezinfectate. Hiperimunizarea animalelor provenite din crescătorii nu va fi începută decît după o perioadă de o săptămînă, care serveşte atît la aclimatizarea animalelor, cît şi la prevenirea eventualelor epizootii.

Determinarea vîrstei

Dacă nu se cunoaşte data naşterii animalelor, vîrsta lor poate fi determinată cu oarecare aproximaţie, după greutatea lor vie (tabelul nr. 19).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL NR. 19

Greutatea vie a animalelor de laborator în raport cu vîrsta

Specia şi vîrsta în zile	Greutatea (g)	
	mascul	femelă
Iepuri Chinchilla, Alasca şi Havana		
La naştere	46— 50	43— 48
20	170— 200	155— 180
60	820— 950	790— 900
120	2 100—2 300	1 700—2 000
180	3 150—3 500	2 900—3 100
Cobai		
La naştere	73	74
20	153	148
41	274	272
58	400	365
84	610	488
Şobolani albi		
La naştere	2,1	2,1
30	48,5	45,7
60	122,9	107,1
120	223,2	173,4
243	279,7	209,6
485	326,0	268,7
Şoareci albi		
La naştere	1,47	1,47
10	18,80	16,98
20	24,76	21,70
30	26,77	24,54

Durata vieţii animalelor este variabilă. Astfel, şoarecele trăieşte 3—4 ani, şobolanul şi cobaiul trăiesc între 3 şi 5 ani, iar iepurele atinge 7—8 ani. Pentru producerea antiserurilor trebuie folosite animale adulte, cu sistemul imunologic maturat. Se vor putea folosi iepurii între 6 şi 20 de luni, şobolanii şi şoarecii între 4 şi 12 luni, cobaii între 6 şi 12 luni, iar găinile între 6 şi 18 luni, vîrste la care aceste animale au o capacitate maximă de producere a anticorpilor.

Determinarea sexului

Sexul nu influenţează sensibil răspunsul imunologic al animalelor (36). Totuşi, determinarea sexului este importantă pentru a împiedica reproducerea animalelor în perioada de hiperimunizare, femelele gestante avînd reactivitatea imunologică modificată.

Determinarea sexului la iepuri şi cobai se face astfel : animalul este apucat cu o mînă de pliul cutanat al regiunii cervicale, împreună cu urechile, iar cu cealaltă mînă se trage coada la o parte, ţinînd-o între degetul inelar şi mediu, iar cu degetul mare şi arătător se întinde pielea din jurul orificiului genital. La mascul, se observă un orificiu rotund, din care proeminează penisul, iar la femelă, o fantă longitudinală care se îngustează spre spate. La femelele de şoareci şi şobolani distanţa dintre orificiile genital şi anal este mult mai mică decît la mascul. În plus, femelele au mult mai bine dezvoltate mamelele.

Cîteva indicaţii asupra reproducerii şi gestaţiei animalelor de laborator sînt arătate în tabelul nr. 20.

TABELUL NR. 20

Date privind reproducerea şi gestaţia la animalele de laborator

Specia	Vîrsta maturităţii sexuale la mascul (în zile)	Durata gestaţiei (în zile)	Durata alăptării (în zile)	Nr. puilor	Nr. fătărilor (pe an)
Iepure	120—180	35	15—30	5—6	4—5
Cobai	60—90	62—72	15—20	2—5	4
Şobolan	90—120	25—30	15	4—5	3—4
Şoarece	90—120	20	20—25	5—8	4—5

3. Întreţinerea animalelor

MARCAREA

Pentru păstrarea unei evidenţe a animalelor se recomandă marcarea lor, fie prin tatuare, fie prin fixarea unor plăci metalice cu numere. Marcarea şobolanilor şi a şoarecilor se face pe faţa interioară a urechii după următoarea tehnică : se imobilizează animalul, se şterge urechea cu un tampon de vată înmuiat în alcool şi se înţeapă apoi urechea cu un ac potrivit. Se scrie prin înţepături numărul dorit şi apoi se aplică pe locul înţepăturilor tuş negru.

Plăcile de metal se fixează la iepuri, cobai şi găini. Plăcile au două capete ascuţite care străpung urechea animalului şi apoi se fixează prin îndoirea celor două capete. La păsări se fixează placa numerotată în aripă sau se pun inele numerotate la picioare.

ÎNGRIJIREA

Succesul imunizărilor depinde în mare măsură de starea sănătăţii animalelor. Slăbirea animalelor sau îmbolnăvirea lor, datorită proastei îngrijiri, scade reactivitatea lor imunologică, compromiţînd experienţele.

În cuştile animalelor trebuie să domnească o curăţenie perfectă, asigurată prin curăţirea zilnică a grătarelor de scurgere, a excrementelor şi a vaselor de hrană. Încăperile în care sînt

Scanned with OKEN Scanner

ţinute cuştile cu animale trebuie să fie bine luminate, aerisite şi cu temperatura constantă. Iepurii pot fi ţinuţi în cuşti aşezate în aer liber, la adăpost de intemperii. Temperatura optimă pentru şoareci şi şobolani este de 22—24°C, iar pentru iepuri şi cobai 18—20°C.

Hrănirea

Hrana animalelor de laborator trebuie să conţină toate principiile nutritive. În alcătuirea raţiilor alimentare trebuie avut în vedere dacă animalul este sau nu în creştere, dacă este donator de sînge etc.

Un rol important îl joacă administrarea judicioasă a vitaminelor. Dacă în timpul alimentaţiei de primăvară, vară şi toamnă se asigură într-o raţie bine echilibrată şi cantitatea necesară de vitamine, nu trebuie uitat că iarna, hrana animalelor trebuie completată prin cantităţi corespunzătoare de vitamine A, B, C şi D.

Alimentaţia iepurilor (raţia zilnică pentru 10 animale în greutate medie de 2 kg) : 0,2 kg de fîn, 3 kg de lucernă pălită, de varză, de porumb furajer sau de iarbă de Sudan, 2 kg de spanac sau salată, 0,5 kg de ovăz, 0,2 kg de făină de oase sau cretă, 1,5 g de sare. Iarna se va administra aceeaşi alimentaţie, însă hrana verde va fi înlocuită cu 2 kg sfeclă sau morcovi.

Alimentaţia cobailor (raţia zilnică pentru 10 animale în greutate medie de 400 g) : 1,5 kg de lucernă pălită, varză, salată, spanac, iarbă sau porumb furajer, 0,3 kg de ovăz , 5 g de făină de oase sau cretă, 1 g de sare. Hrana verde se înlocuieşte iarna prin 0,5 kg de fîn şi 1 kg sfeclă sau morcovi.

Alimentaţia şobolanilor (raţia zilnică pentru 10 animale în greutate medie de 150 g) : 150 g de pîine sau 75 g de mălai, 150 g de lapte, 100 g de ovăz sau orz, 50 g de spanac, salată sau morcovi, 5 g de făină de oase sau cretă, 5 g de seminţe de floarea soarelui, 1 g de sare. O dată pe săptămînă se dau 50 g de ficat sau carne crudă. Iarna se administrează aceeaşi alimentaţie, cu excepţia salatei sau spanacului, în locul cărora se dau 50 g de morcovi. În plus, o dată pe săptămînă se administrează 5 g de untură de peşte, emulsionată în lapte.

Alimentaţia şoarecilor (raţia zilnică pentru 10 animale în greutate medie de 16—20 g) : 40 g de pîine sau 20 g de mălai, 40 g de lapte, 40 g de ovăz, 10 g de morcovi, salată sau spanac, 3 g de seminţe de floarea soarelui, 1 g de făină de oase sau cretă, 0,1 g de sare. O dată pe săptămînă se dă 10 g de grîu. Iarna se foloseşte aceeaşi alimentaţie, însă în locul salatei sau spanacului se dau 10 g de morcovi. Untura de peşte, 1 g, se administrează emulsionată în lapte.

Alimentaţia găinilor (raţia zilnică pentru 10 păsări în greutate medie de 1,8 kg) : 1,5 kg de porumb, orz, ovăz sau tărîţe, 20 g de făină de sînge, resturi de rădăcinoase, verdeaţă şi cărbune (mangal).

Bolile (25)

După depistarea unei maladii, animalul se izolează imediat şi cuşca în care a stat este dezinfectată cu o soluţie 5% lizol, creolină sau formalină. Cuştile metalice se ard cu o lampă de benzină. Dacă animalul bolnav sau mort a mai fost în cuşcă cu alte animale, atunci acestea vor fi mutate în cuşti curate şi ţinute sub observaţie.

Scanned with OKEN Scanner

Bolile infecţioase acute cele mai răspîndite sînt :

Pasteureloza, care afectează majoritatea animalelor mici de laborator, în special iepurii. La începutul bolii se observă o umectare a şanţului nazolabial, animalul strănută şi îşi freacă botul cu labele anterioare. Secreţia nazală devine cu timpul purulentă, albicioasă. Animalul respiră greu. În unele cazuri apare diareea, temperatura creşte şi animalul moare.

Depistarea precoce a animalelor bolnave se face prin introducerea în cavitatea nazală a 0,2 ml dintr-o soluţie de verde briliant 0,2%. Animalele purtătoare de bacili vor elimina un jet purulent.

Paratifosul de care se îmbolnăvesc cel mai frecvent şobolanii şi şoarecii. Animalele bolnave sînt puţin mobile, nu se hrănesc, au diaree cu materii fecale de culoare verzuie sau gălbuie. Moartea survine la 24 de ore după primele simptome.

Pneumonia infecţioasă se întîlneşte foarte frecvent la cobai, primăvara şi toamna. Animalele bolnave tuşesc, au secreţii nazale, respiraţie dispneică, febră, inapetenţă şi părul zbîrlit Boala durează cîteva zile şi se încheie de cele mai multe ori cu moartea animalului.

IV. HIPERIMUNIZAREA ANIMALELOR

Introducerea antigenului în organismul animalelor de experienţă se poate realiza prin numeroase tehnici de inoculare. Răspîndirea rapidă a antigenului în întreg organismul este asigurată prin inoculări intravenoase şi intraperitoneale. Dimpotrivă, antigenul se va răspîndi lent şi treptat prin injectarea sa intramusculară sau subcutanată.

Pentru reuşita hiperimunizărilor trebuie aleasă nu numai cea mai adecvată cale de introducere a antigenului, ci trebuie corect stabilite condiţiile de hipermunizare care privesc puritatea antigenului, doza totală de antigen administrată, ritmul în care se efectuează injectarea porţiunilor de antigen şi durata hiperimunizărilor.

Doza antigenului, ritmul şi durata administrării lui sînt dependente de structura chimică a antigenului şi de specia animalului injectat. Din acest motiv nu se poate prescrie o schemă de hiperimunizare unică, care să se aplice cu un succes egal la toate antigenele proteice sau polizaharidice, folosind oricare din animalele de laborator recomandate înainte. Pentru hiperimunizarea cu proteine şi polizaharide avînd o antigenicitate cunoscută (proteine serice, dextran, polizaharidul pneumococic ş.a.) se pot aplica, fără un control prealabil, schemele „clasice" de hiperimunizare care vor da întotdeauna rezultatele scontate. În schimb, proteinele cu antigenicitate necunoscută vor trebui administrate cel puţin în două scheme diferite iar numărul animalelor va fi mai mare decît la injectarea antigenelor cunoscute.

1. Inocularea antigenelor (30)

Alegerea căii de inoculare depinde în mare măsură de natura antigenului care urmează a fi injectat. Antigenele toxice (toxinele microbiene, fitaglutininele etc.) nu vor fi niciodată administrate pe cale intravenoasă,

Scanned with OKEN Scanner

deoarece chiar în cantităţi mici vor provoca moartea animalului de experienţă. Injectarea intravenoasă este permisă numai după anularea toxicităţii lor printr-un tratament fizico-chimic adecvat, care nu modifică esenţial antigenicitatea lor (33). Pentru obţinerea unui antiser faţă de substanţe cu o antigenicitate slabă, se injectează întotdeauna antigenul în asociaţie cu adjuvant Freund. Prezenţa adjuvantului exclude folosirea căii intravenoase. Calea de inoculare influenţează cantitatea anticorpilor formaţi (49)(48) (tabelul nr. 21).

TABELUL NR. 21

Căile de administrare şi detectare a anticorpilor la cobaii adulţi injectaţi cu γ-globulină bovină (adaptat după J. H. Humphrey, 1960)

Timpul de sîngerare după ultima injecţie (în zile)	Cantitatea de anticorp după injectare :		
	intravenoasă	intraperitoneală	intramusculară
5	18,4	20,4	21,2
9	22,0	24,6	25,2
14	21,4	25,6	30,4
30	11,6	25,6	35,8
42	12,0	25,0	36,6

* S-au alcătuit trei loturi de cîte 5 animale. Primul lot de animale a primit 100 mg de proteină în 5 injecţii intravenoase, al doilea lot în 5 injecţii intaperitoneale, iar lotul al treilea aceeaşi cantitate de proteină, în 2 injecţii intramusculare asociată cu adjuvant Freund. Durata imunizărilor — 9 zile. Cantitatea anticorpilor este exprimată prin diametrul reacţiei cutanate de anafilaxie pasivă (în mm).

Administrarea intramusculară a antigenului nu numai că declanşează formarea unei cantităţi mai mari de anticorpi decît în cazul folosirii celorlalte două căi (intravenoasă şi intraperitoneală), dar concentraţia lor se menţine la un nivel ridicat un timp mai îndelungat. Sub acest aspect calea intravenoasă apare cea mai puţin eficientă. De asemenea calea subcutanată de inoculare a antigenului are o eficienţă mai mare decît calea intravenoasă ; se ating concentraţii mai mari de anticorpi, iar persistenţa lor în sînge este mai îndelungată (94).

Calea de injectare a animalelor determină şi locul de formare a anticorpilor (90). Astfel la injectarea subcutanată sau intramusculară a antigenului, anticorpii se vor forma la locul injecţiei şi în ganglionul limfatic regional corespunzător. Dacă antigenul este injectat intravenos, el se răspîndeşte în întreg corpul şi formarea anticorpilor are loc în splină şi în ţesutul limfoid (74).

Dacă presupunem că anticorpii produşi de splină şi ganglionii limfatici nu sînt identici, este de aşteptat ca tipul anticorpilor formaţi să varieze în raport cu calea de inoculare a antigenului. Într-adevăr, s-a constatat că inocularea intravenoasă a antigenelor bacteriene la cai duce la formarea unor anticorpi precipitanţi cu titru ridicat, în timp ce la inocularea subcutanată animalele formează anticorpi doar într-o mică măsură

Scanned with OKEN Scanner

(102)(101). La imunizarea cailor cu anatoxină se constată un tablou schimbat : calea subcutanată sau intramusculară determină formarea anticorpilor de tip precipitant, în timp ce calea intravenoasă nu produce anticorpi (101). Aceste rezultate, ca şi altele necitate au condus la statornicirea părerii că locul introducerii antigenului influenţază tipul de anticorpi formaţi.

Indiferent de calea de administrare a antigenului, întîi apar anticorpii γM şi apoi γG. Singura deosebire este aceea că, în cazul inoculării subcutanate, durata producerii anticorpilor γM este considerabil mai lungă decît în cazul injectării intravenoase a antigenului (94). Capacitatea anticorpilor de a se combina cu antigenul specific (aviditatea) creşte pe măsură ce imunizarea progresează însă această evoluţie nu depinde nici de calea de administrare şi nici de doza administrată (54). Deci variaţia *calităţii* anticorpilor nu depinde de acelaşi factor ca şi variaţia *cantităţii* (concentraţia anticorpilor din antiser depinde de calea de inoculare şi de doza antigenului).

Legătura dintre calea introducerii antigenului şi cantitatea, probabil şi calitatea anticorpilor formaţi, arată că hiperimunizarea trebuie realizată atît prin inoculări intravenoase sau intraperitoneale, cît şi prin inoculări intramusculare sau subcutanate. De cele mai multe ori se preferă la imunizarea aceluiaşi animal aplicarea alternativă a ambelor procedee.

Antigenul steril sau conţinînd antibiotice, cu sau fără adjuvant, va fi inoculat întotdeauna folosind ace şi seringi sterilizate printr-o fierbere prealabilă de 15 min. În timpul inoculării, animalele vor fi imobilizate manual sau cu aparatele de contenţie, descrise la paragraful V, 1.

Inocularea subcutanată

Seringa pentru inoculare trebuie să fie prevăzută cu un ac avînd diametrul de 0,7—0,8 mm. Locul de inoculare şi volumul soluţiei de antigen administrate variază în raport cu animalul. Şoarecii pot primi sub pielea spatelui pînă la 1 ml de soluţie, iar şobolanii, în acelaşi loc, pînă la 10 ml de soluţie. La cobai şi iepuri inoculările se fac sub pielea de pe flancuri ; cobaii pot primi pînă la 15 ml, iar iepurii pînă la 30 ml de soluţie. La găini se pot introduce chiar 40 ml soluţie sub pielea gîtului.

Tehnica. Se epilează [1] părul de pe locul de inoculare şi se dezinfectează pielea cu tinctură de iod. Se prinde pielea între degetul mare şi arătătorul mîinii stîngi şi se ridică. Se introduce acul la baza triunghiului de piele format pînă cînd vîrful se simte liber în ţesutul conjunctiv subcutanat. Se lasă pielea liberă şi se injectează antigenul încet. Se roteşte seringa cu acul circa 45° faţă de poziţia iniţială şi se scoate acul. În acest fel se evită refularea soluţiei prin orificiul provocat de ac.

[1] Părul se îndepărtează cu ajutorul unei paste depilatoare preparate prin amestecarea a 30 g monosulfură de sodiu cu 70 g apă. Se aplică pasta obţinută pe suprafaţa aleasă în cantitatea potrivită, se aşteaptă uscarea şi apoi se îndepărtează cu apă pasta uscată şi părul.

Scanned with OKEN Scanner

Inocularea intramusculară

Acele folosite în acest scop au un diametru de 0,8 mm. La şoareci se administrează 0,5 ml, la şobolani 5 ml, iar la iepuri 8 ml soluţie de antigen cu sau fără adjuvant. În toate cazurile injectarea se practică în muşchii coapsei. La găini se pot inocula pînă la 6 ml de soluţie în muşchii pectorali, folosind un ac fin de 0,4 mm pentru a evita hemoragia.

Tehnica. Se epilează părul de pe faţa externă a coapsei, se dezinfectează şi se introduce brusc acul în masa musculară. Trebuie evitată atingerea osului. Inocularea se face încet.

Absorbţia antigenului introdus pe cale intramusculară se face mai repede decît în cazul inoculării subcutanate.

Inocularea intraperitoneală

Injecţia intraperitoneală se efectuează cu un ac de 0,7 mm diametru. Se pot introduce în cavitatea peritoneală pînă la 2 ml la şoarece, 10 ml la şobolani, 25 ml la cobai, 40 ml la iepure şi 50 ml la găini.

Tehnica. Se epilează regiunea subombilicală şi se dezinfectează. Un ajutor contenţionează animalul ţinîndu-l de pielea cefei şi labele posterioare, prezentînd operatorului regiunea ventrală foarte bine întinsă. Se ridică pielea regiunii subombilicale şi la fel ca în cazul injecţiilor subcutanate, se înţeapă animalul la baza pliului subcutanat. Se ridică apoi seringa cu acul perpendicular pe peretele abdominal, se lasă pielea liberă şi se perforează peretele muscular. Se împinge acul 2—3 mm în cavitatea peritoneală şi inocularea se face încet.

La păsări inocularea intraperitoneală se face la nivelul liniei mediane, la egală distanţă de stern şi de cloacă.

Inocularea intravenoasă

Soluţiile de antigen destinate injecţiilor intravenoase vor fi limpezi, lipsite de suspensii. Este permisă doar asocierea gelului de aluminiu ca adjuvant. Soluţia din seringă nu trebuie să conţină bule de aer, altfel animalul poate muri în cîteva secunde prin embolie gazoasă. Pentru solvirea antigenului se recomandă folosirea soluţiei saline fiziologice (NaCl 0,145 M). Tehnica de inoculare variază cu specia animalului folosit.

Tehnica la şoarece şi la şobolan. Injecţiile se efectuează în vena cozii. Se foloseşte un ac de 0,4 mm diametru. La şobolan se pot introduce pînă la 2 ml, iar la şoarece numai 0,5 ml soluţie. În timpul inoculării, animalele se introduc într-un cilindru de contenţie care lasă coada liberă. Pentru evidenţierea venei se imersează coada într-un vas cu apă caldă sau se freacă cu xilol şi apoi cu alcool. Se apucă coada animalului între degetul mare şi arătătorul mîinii stîngi şi se caută vena cea mai proeminentă. Se introduce acul cu bizoul în sus, se controlează dacă este în venă şi soluţia de antigen se inoculează încet. După scoaterea acului se tamponează locul injectării cu vată.

Tehnica la cobai. Injecţiile se efectuează în vena aflată pe faţa posterioară şi internă a coapsei, cu un ac de 0,4—0,6 mm diametru. Vena este mai vizibilă la cobaii albi decît la cei colorati. Se pot introduce pînă la 5 ml de soluţie. Animalul este ţinut de un ajutor. Se îndepărtează părul de pe partea posterioară şi internă a coapsei, după care se dezinfectează locul. Se comprimă baza membrului inferior cu un garou, ceea ce evidenţiază vena. Se introduce acul

Scanned with OKEN Scanner

spre baza membrului, se scoate garoul şi se inoculează încet soluţia de antigen. După scoaterea acului se tamponează locul injectării.

Tehnica la iepure. Injecţiile se fac în vena marginală externă a urechii. Se foloseşte un ac cu bizoul scurt, avînd diametrul de 0,5 mm. Cantitatea de soluţie injectată nu trebuie să depăşească 15 ml. În timpul inoculării animalele vor fi imobilizate cu mîna de către un ajutor sau într-o cutie specială de contenţie, care lasă liber numai capul animalului (v. paragraful V/1).

Se caută un loc cît mai departe de baza urechii unde vena este încă vizibilă. Se epilează părul, iar vena se pune în evidenţă fie prin baterea urechii cu mîna sau comprimarea ei la bază, fie prin frecarea urechii cu un tampon de vată înmuiat în xilol, care se îndepărtează apoi cu alcool. Se apucă apoi urechea cu partea externă în sus, între degetul mare şi arătătorul mîinii stîngi. Se introduce acul oblic în venă, cu bizoul în sus (fig. 51). Se controlează dacă acul este în venă, aspirînd o cantitate mică de sînge. Se injectează apoi încet soluţia antigenică. Concomitent cu înlăturarea compresiei de la baza urechii se retrage acul şi locul injectării se compresează cu un tampon de vată.

Fig. 51. — Punctionarea venei marginale a urechii de iepure.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica la păsări. Cea mai accesibilă pentru injecţii intravenoase este vena umerală, aflată sub pielea feţei inferioare a aripei, întretăind faţa anterioară a articulaţiei umerocubitale. Se folosesc ace cu un diametru de 0,5 mm. Se pot introduce 10 ml soluţie. Pasărea se ţine de către un ajutor, întinzînd una din aripi cu faţa interioară spre operator. Se smulg penele care stînjenesc abordarea venei, se dezinfectează pielea şi se comprimă vasele la baza aripei. Vena se pune bine în evidenţă. Se înţeapă pielea şi apoi, cu atenţie, peretele vasului pentru a nu-l perfora. După injectare se comprimă locul cu un tampon de vată.

Inocularea intratesticulară

În unele cazuri, folosirea acestei căi de inoculare permite obţinerea unor antiseruri cu o cantitate mare în anticorpi (95), care se poate practica la iepure şi cobai. La aceste animale testiculele sînt retrase în abdomen, de aceea ele trebuie coborîte în scrot prin comprimarea părţii inferioare a abdomenului. Se epilează părul de pe scrot, se dezinfectează şi se fixează testiculul coborît, ţinîndu-l între degetul mare şi arătătorul mîinii stîngi. Se introduce acul în centrul testiculului şi se injectează încet pînă la 25 ml de lichid. Se scoate acul şi se tamponează locul injectării.

2. Condiţiile de hiperimunizare

La alcătuirea unei scheme de hiperimunizare trebuie luaţi în considerare următorii parametri: puritatea antigenului, doza de antigen administrată, ritmul inoculărilor şi durata hiperimunizării animalelor.

Puritatea antigenului

Antiserurile monospecifice [1] se obţin prin injectarea animalelor cu un preparat antigenic cît mai pur posibil. Dacă nu se poate prepara decît o cantitate mică de antigen pur, atunci acesta se va folosi exclusiv pentru prima inoculare. Ulterior, se poate injecta şi un material antigenic mai puţin purificat. Cum stimulul primar influenţează puternic specificitatea răspunsului imunologic, prin acest procedeu se reduce considerabil cantitatea anticorpilor care se formează faţă de impurităţile prezentate în materialul antigenic (27)(2). Desigur, în aceste cazuri nu se asociază niciodată adjuvanţi pentru a nu mări stimulul antigenic al impurităţilor şi a provoca astfel apariţia anticorpilor indezirabili.

Antiserurile monospecifice se pot obţine şi prin hiperimunizarea animalelor cu antigene nepurificate, cu condiţia ca să se folosească fenomenul de toleranţă imunologică dobîndită. Aplicarea acestui procedeu se bazează pe faptul că animalele, care au primit în perioada dezvoltării

[1] Se numesc monospecifice antiserurile care conţin anticorpi numai faţă de un anumit antigen.

Scanned with OKEN Scanner

embrionare sau imediat după naştere un antigen eterolog, nu sînt capabile, la maturitate, să elaboreze anticorpi faţă de acest antigen. Inhibarea reactivităţii imunologice (toleranţa) este specifică şi poate dura un timp îndelungat, în funcţie de doza de antigen şi de durata administrării sale (21)(59). Toleranţa apare atît faţă de izoantigene, cît şi faţă de antigenele animalelor de altă specie.

Inocularea animalelor, în perioada embrionară sau în perioada postnatală imediată, cu impurităţile antigenice creează la maturitate o toleranţă faţă de aceste impurităţi şi permite obţinerea antiserurilor monospecifice capabile să reacţioneze numai cu un antigen dat.

Doza de antigen inoculată (5)

Cantitatea totală de antigen administrată animalelor în timpul întregii perioade de hiperimunizare este dependentă de antigenicitatea materialului studiat. Pentru fiecare antigen există două valori-limită ale cantităţii administrate : una minimă sub care animalul nu produce anticorpi sau îi produce în cantităţi insuficiente, şi alta maximă, peste care ori de cîte ori se măreşte doza, producerea anticorpilor rămîne constantă sau înregistrează o creştere neînsemnată. Doze masive de antigen pot paraliza complet aparatul imunologic formator de anticorpi (vezi cap. V). Între aceste două valori, cantitatea anticorpilor formaţi variază cu cantitatea antigenelor administrate. Concentraţia anticorpilor umorali nu creşte însă proporţional cu creşterea dozei de antigen (tabelul nr. 22).

TABELUL NR. 22

Raportul dintre diferite doze de S. paratyphi şi titrul anticorpilor aglutinanţi formaţi la iepure (după G. S. Wilson şi colab., 1955).

Numărul de bacili administraţi pe kg/corp	Numărul de animale injectate	Titrul (valoare medie)
10^4	4	0
10^5	6	1/330
10^7	3	1/1 860
10^8	3	1/3 540

În intervalul 10^5 şi 10^8 concentraţia anticorpilor a crescut abia de 10 ori, deşi doza de antigen administrată a fost mărită de o mie de ori.

Administrînd iepurilor γ-globulină de bou s-a constatat un fenomen similar : mărind de 10 ori doza de antigen (de la 4 mg la 40 mg), titrul anticorpilor a crescut numai de 3 ori (98). Pe baza acestor rezultate şi pe altele similare s-a elaborat o formulă empirică, care exprimă ra-por-

tul dintre doza de antigen administrată şi cantitatea anticorpilor formaţi (97) :

$$C_{ac} = kC_{ag}^{1/n}$$

unde C_{ac} = concentraţia maximă a anticorpilor umorali; C_{ag} = doza de antigen administrată ; k şi n = constante. Constanta k poate exprima antigenicitatea materialului în condiţiile unei experienţe date, iar valorile lui n par să depindă de natura şi compoziţia chimică a antigenului (proteine 1,9, polizaharide 2,6 şi lipopolizaharide 3,6). Relaţia este valabilă numai pentru doze de antigen moderate.

Modul în care creşte concentraţia anticorpilor umorali, dacă doza de antigen este mărită continuu, depinde de raportul $1/n$, deci de natura chimică a antigenului injectat. Cu alte cuvinte, dozele de antigen, capabile să provoace un răspuns imunologic optim, variază de la antigen la antigen. Există antigene care stimulează formarea unei cantităţi importante de anticorpi, chiar dacă se administrează în cantitate mică, într-o singură inoculare. Cu alte antigene, dimpotrivă, se obţine un răspuns imunologic similar numai dacă ele sînt injectate repetat într-o cantitate mare sau dacă li se asociază adjuvanţi. Astfel, la şoareci doza minimă imunizantă variază cu tipul chimic al polizaharidului pneumococic folosit : 0,01 μg (tipul I), 0,0025 μg (tipul II) şi 0,1 μg (tipul III). Pentru γ-globulina de bou, doza minimă imunizată este mult mai mare (125 μg).

Fixarea dozei de antigen depinde şi de specia animalului injectat şi de greutatea lui corporală. În general, hiperimunizarea iepurilor reuşeşte foarte bine dacă se administrează în total între 25 şi 250 mg proteine dotate cu o antigenicitate mijlocie. Acelaşi efect se realizează la şoareci cu cantităţi considerabil mai mici (5—25 mg). Injectarea şoarecilor de 3 luni cu 150 mg γ-globulină bovină poate să nici nu provoace formarea anticorpilor datorită instalării paraliziei imunologice (29). Este de reţinut că asocierea adjuvantului Freund poate şterge efectul paralizant al acestei cantităţi, şoarecii sintetizînd intens anticorpii corespunzători. În general, asocierea adjuvantului Freund micşorează cantitatea de antigen necesară pentru hiperimunizarea animalelor.

Ritmul inoculărilor

Doza de antigen aleasă nu se introduce animalului printr-o injecţie unică, ci se împarte în mai multe porţiuni care se administrează apoi la diferite intervale de timp. Injecţiile succesive de antigen determină formarea mai rapidă şi mai intensă a anticorpilor, ca urmare a răspunsului secundar (vezi cap. V).

Ritmul în care se injectează fracţiunile din doza totală de antigen influenţează, desigur, formarea anticorpilor. Din păcate, nu există un material experimental suficient de concludent pentru a se putea stabili intervalele de timp optime la care trebuie efectuate inoculările. Intervalul dintre două injecţii este ales arbitrar de către experimentator. În general,

Scanned with OKEN Scanner

injectările intravenoase trebuie efectuate mai frecvent (o dată la 2—3 zile) decît cele intramusculare sau subcutanate (o dată la 7—8 zile).

După ultima injectare se face o pauză de 7—12 zile, interval în care anticorpii ating concentrația maximă. După acest timp se recoltează sîngele, cu sau fără sacrificarea animalului. În ultimul caz, hiperimunizarea poate fi reluată la 3—5 săptămîni de la ultima injecție, aplicînd aceeași schemă sau numai cîteva injecții de „rapel" la intervale mai mari de timp.

Numărul inoculărilor poate varia foarte mult; antigenul poate fi administrat atît în două porțiuni, cît și în cîteva zeci. Cantitățile introduse prin fiecare injecție pot fi mereu egale sau pot crește treptat pînă la o valoare finală de cîteva ori mai mare decît cea inițială. Astfel, 150 mg de antigen proteic poate fi administrat subcutanat unui iepure într-un ritm de o injecție la 7 zile, în următoarea progresie : 10 mg, 20 mg, 40 mg și 80 mg. Dacă dozele se măresc progresiv și se administrează la intervale mici, poate surveni „oboseala imunologică" a organismului, titrul anticorpilor nu numai că nu crește dar el începe chiar să scadă.

Doza de antigen și ritmul inoculărilor determină uneori și tipul de anticorpi care se formează. Astfel dacă la a doua și următoarele inoculări se introduce o doză mică de antigen atunci se formează aproape exclusiv anticorpi γG, în timp ce administrarea unei doze mari de anticorpi determină sinteza ambelor feluri de anticorpi. Se poate astfel ca pentru anumite antigene și scheme de hiperimunizare, prezența în sînge a anticorpilor γM să fie o trăsătură constantă a răspunsului secundar (19)(104).

Durata hiperimunizării

Momentul în care anticorpii serici ating concentrația lor maximă marchează sfîrșitul inoculărilor. Urmărind și măsurînd periodic titrul anticorpilor, experimentatorul poate determina exact durata hiperimunizării animalelor. Ea depinde de cantitatea inoculată și de ritmul în care a fost introdus antigenul în organism. În general, schemele obișnuite de hiperimunizare durează 5—8 săptămîni.

Formarea succesivă a anticorpilor γM și γG ca răspuns la un stimul antigenic a fost descrisă pentru un număr mare de specii ca : iepurele (11) (15), cobaiul (104) și păsările (16). În majoritatea cazurilor prima inoculare conduce la formarea anticorpilor γM și γG, deși s-a arătat frecvent că producerea anticorpilor γM este mai timpurie. Apariția anticorpilor γG poate fi întîrziată cu cîteva zile după ce γM s-a format și uneori poate să se producă abia după a doua inoculare.

Cinetica formării anticorpilor la cobai în urma administrării bacteriofagului este redată în figura 52. Imunizarea fiind practicată pe cale intravenasă, este posibil ca în prima fază anticorpii din clasa γM și γG să fie

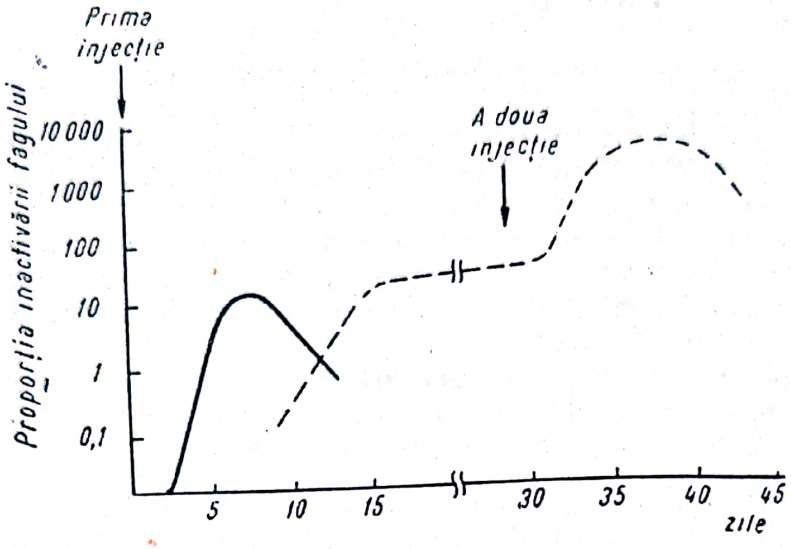


Fig. 52. — Formarea anticorpilor la cobai după inocularea bacteriofagului Φ X 174 (adaptată după J. W. U h r, 1964). Linia plină: anticorpi de tip 19 S (γM); linia întreruptă: anticorpi de tip 7 S (γG).

sintetizați numai de celulele splenice, iar creșterea ulterioară a anticorpilor γG să fie provocată de sinteza lor în celulele extrasplenice.

Chiar în cadrul aceleiași clase de anticorpi se constată apariția unei diversități de forme moleculare în raport cu durata hiperimunizării (91). Astfel, cobaii hiperimunizați produc două tipuri de anticorpi γG; cei cu constanta de sedimentare 6,3 apar la scurt timp după introducerea antigenului, iar cei cu 6,5 S au fost semnalați într-o perioadă mai tîrzie a imunizării (14).

Rezultatele înfățișate mai sus arată că în timpul hiperimunizării compoziția calitativă a anticorpilor suferă schimbări însemnate. Corespunzător acestei situații, capacitatea de combinare a anticorpilor cu antigenul specific variază continuu în cursul hiperimunizării (103) (22). Astfel, la inocularea iepurilor cu albumină serică de bou s-a constatat că reactivitatea anticorpilor serici crește pe măsură ce hiperimunizarea avansează; raportul N anticorp/N antigen în precipitatele imune este de cel puțin 2 ori mai mare la sfîrșitul perioadei de hiperimunizare decît la începutul ei (28).

Dacă reactivitatea anticorpilor crește continuu în timpul hiperimunizării animalelor, în schimb specificitatea lor tinde să scadă (73). Antiserurile obținute în urma unor hiperimunizări prelungite sînt capabile să reacționeze nu numai cu antigenul injectat, ci și cu alte antigene mai mult sau mai puțin înrudite. Deoarece reacțiile încrucișate complică interpretarea rezultatelor, hiperimunizarea trebuie încheiată atunci cînd antiserul reacționează specific, exclusiv cu antigenul injectat.

Scanned with OKEN Scanner

3. Scheme pentru hiperimunizare

Există o foarte mare varietate de scheme pentru hiperimunizarea animalelor.

Fiecare autor, în raport cu scopurile cercetărilor întreprinse, își poate alcătui o schemă de hiperimunizare originală. De aceea, pentru unul și același antigen, literatura menționează numeroase scheme de hiperimunizare, toate utilizate cu succes. Numărul lor mare se explică prin faptul că prepararea unui antiser puternic reușește prin aplicarea mai multor scheme care diferă una de cealaltă prin toți parametrii amintiți în cele două paragrafe precedente.

Vom prezenta cîteva scheme de hiperimunizare, recomandate în tratatele de specialitate de mare circulație și care, aplicate în cercetările noastre, ne-au dat întotdeauna satisfacție.

Schema recomandată de E. A. Kabat (68). Se amestecă soluția de antigen cu gelul de aluminiu astfel ca suspensia rezultată să conțină 1,5 mg proteină/ml. Antigenul se inoculează la iepuri într-un ritm de 2—4 injecții pe săptămînă, astfel : 3 injecții de 1 ml, 3 injecții de 1,5 ml, 4 injecții de 2 ml, 4 injecții de 3 ml, 2 injecții de 5 ml. Prima injecție a fiecărei serii se administrează subcutanat sau intraperitoneal, iar restul intravenos. În total se inoculează 56,25 mg proteină. Cantitatea poate fi variată între 10—100 mg. Antiserul se recoltează la 5—7 zile de la ultima injectare.

Schema recomandată de P. Grabar (52). Această schemă se poate folosi pentru hiperimunizarea iepurilor cu serul diferitelor animale. Antigenul se inoculează pe cale subcutanată. În prima săptămînă se injectează 0,5 ml ser sanguin amestecat cu 1,5 ml de soluție salină fiziologică și 2 ml de adjuvant Freund complet ; în a doua săptămînă 1,0 ml ser sanguin + 1,0 ml de soluție salină + 2 ml de adjuvant ; în a treia săptămînă 2,0 ml de ser sanguin + 2 ml de adjuvant ; în săptămînile 4, 5 și 6 se injectează de patru ori pe săptămînă ser diluat (o parte ser + 8 părți de soluție salină fiziologică) fără adjuvant, în următoarele cantități : săptămîna a 4-a cîte 0,5 ml, săptămîna a 5-a cîte 1 ml și săptămîna a 6-a cîte 2 ml. Sîngerarea se practică la 8—10 zile după ultima injecție. Dacă proteinemia serurilor folosite oscilează în jur de 7,00 g%, cantitatea totală de antigen administrată unui animal variază în jur de 350 mg.

Această schemă poate fi aplicată cu egal succes înlocuind adjuvantul Freund prin gel de hidroxid de aluminiu (78).

Schema recomandată de W. C. Boyd (20). Se prepară o soluție salină fiziologică de antigen cu sau fără adaos de gel de aluminiu. Soluția conține 10 mg de proteină/ml. Se injectează iepurii intravenos cu cîte 1—2 ml din această soluție. După 6—8 zile se repetă injectarea, iar după alte 6—8 zile se administrează, de această dată intraperitoneal, încă 3—6 ml din soluția de antigen. Sîngerarea se efectuează după 10—14 zile. Cantitatea totală de antigen inoculat este cuprinsă între 50 și 100 mg.

Schema recomandată de G. H. Gell și R. A. Coombs (45). Se prepară un amestec de antigen și de adjuvant Freund, care să conțină 5 mg proteină/ml. Schema se aplică la hiperimunizarea iepurilor. În ziua 1 se inoculează intramuscular cîte 1 ml din această soluție în fiecare coapsă (total 10 mg antigen). Se repetă această inoculare în ziua a 15-a însă ea se practică în fiecare umăr (total 10 mg antigen). În ziua a 21-a se injectează intraperitoneal sau intramuscular 1 ml din soluția apoasă de antigen, fără adjuvant (10 mg antigen). În zilele a 22-a, a 24-a și a 26-a se injectează intravenos cîte 0,5 ml din soluția apoasă de antigen (to-

Scanned with OKEN Scanner

tal 15 mg antigen); injecţiile se repetă exact în acelaşi fel în zilele a 29-a, a 31-a şi a 33-a, cu singura deosebire că se inoculează cîte 1,0 ml (total 30 mg). Sîngerarea se practică la 7—12 zile de la ultima injecţie.

Aceste scheme se pot aplica şi la hiperimunizarea şoarecilor, şobolanilor. cobailor şi păsărilor, cantitatea totală de antigen administrată fiind însă micşorată în mod corespunzător. Literatura menţionează şi numeroase alte procedee prin care se obţin antiseruri puternice de la aceste animale (46) (3) (120) (75) (66) (91).

4. Accidente la hiperimunizare

În cursul hiperimunizării, animalele pot să prezinte fenomene secundare de subreactivitate sau hiperreactivitate, care, în cele mai multe cazuri compromit rezultatelele experienţelor.

Fenomenele de subreactivitate pot fi provocate, aşa cum s-a arătat mai înainte, fie administrînd animalelor doze prea mari sau prea mici de antigen, fie folosind animale prea tinere incapabile să sintetizeze anticorpi într-o cantitate satisfăcătoare. În unele cazuri, se constată subreactivitate imunologică chiar la animale adulte care au primit cantităţi moderate de antigen. De obicei, aceste animale trebuie scoase din experienţă deoarece ele formează anticorpi numai prelungind mult durata hiperimunizării. Antiserurile obţinute de la aceste animale sînt mai puţin specifice decît cele ale animalelor cu reactivitate imunologică normală.

Starea de hiperreactivitate a organismului imunizat se manifestă prin fenomenul de anafilaxie, care poate interesa întregul organism sau numai o zonă locală a sa (Fenomenul Arthus) (71). Animalele cărora li s-a administrat un antigen printr-o injecţie preparativă reacţionează printr-un şoc grav la repetarea injecţiei, după o perioadă de 8—10 zile. Fenomenul de anafilaxie este cauzat de reacţia specifică a anticorpilor cu antigenul, desfăşurată în celule sau în ţesuturi.

Şocul anafilactic mortal poate interveni în cursul hiperimunizării numai dacă antigenul se administrează intravenos. De aceea, folosirea căii intravenoase de introducere a antigenului trebuie făcută cu multă prudenţă, mai ales atunci cînd intervalul dintre două injecţii determină instalarea unei stări de hiperreactivitate. Cobaii pot prezenta şoc anafilactic chiar prin injectarea subcutanată a unor cantităţi mari de antigen. Şocul anafilactic poate fi preîntîmpinat prin desensibilizarea animalelor. Desensibilizarea constă în injectarea intravenoasă a unei cantităţi mici de antigen. După 10—15 min, se poate inocula întreaga cantitate de antigen fără a periclita viaţa animalelor. Şocul anafilactic este determinat de contracţia muşchilor netezi de la nivelul bronhiilor, intestinului, vezicii urinare, vaselor sanguine etc. Şocul se manifestă diferit în raport cu specia animalului. Cobaii sînt agitaţi, părul li se zburleşte, strănută şi tuşesc, îşi scarpină botul cu labele. După cîteva minute animalele cad lateral, inspiră aerul cu dificultate, pierd fecalele şi urina şi în scurt timp mor. Inima continuă să bată cîtva timp după oprirea respiraţiei. Iepurii pre-

Scanned with OKEN Scanner

zintă mai puţine simptome. Animalul în şoc cade lateral, prezintă convulsii accentuate cu pierderea fecalelor şi a urinei şi apoi moare. După deces, spre deosebire de cobai respiraţia mai continuă cîteva minute şi după oprirea inimii. Şobolanii şi şoarecii prezintă mai rar anafilaxie, iar la păsări şocul anafilactic se produce relativ uşor, fiind adesea mortal (72).

Producerea şocului anafilactic depinde şi de natura antigenului folosit la hiperimunizare. În general, globulinele animale sau vegetale sînt substanţe care au capacitate mai mare de a produce şocul anafilactic decît albuminele.

Anafilaxia locală sau fenomenul Arthus se observă de obicei la sfîrsitul perioadei de hiperimunizare a animalelor. Dacă iepurii se injectează subcutanat cu o proteină oarecare, se observă o uşoară reacţie leucocitară care dispare în cîteva zile. După inoculări repetate de antigen, la locul injecţiei apare un edem care se infiltrează şi în centrul său apar pete de culoare roşie închisă. Dacă animalul se găseşte la apogeul răspunsului imunologic, reacţia cutanată poate fi şi mai severă. Centrul focarului inflamator devine dur şi de culoare roşie-neagră, edemul se măreşte. În 6—8 zile o parte din piele se elimină şi se descoperă baza focarului care este plină de o masă albă, sterilă. Dacă nu se infectează, plaga se vindecă în 1—3 luni, rămînînd o cicatrice dură lipsită de păr. Fenomenul Arthus reprezintă o reacţie locală, care apare în ţesuturi datorită combinării, la acest nivel, a antigenului cu anticorpul. Sensibilizarea produsă nu are un caracter local, întreg organismul fiind sensibilizat. De aceea, dacă antigenul se administrează acestor animale pe cale intravenoasă, apare şocul anafilactic corespunzător.

Apariţia plăgilor cutanate nu stînjeneşte desfăşurarea inoculărilor decît în cazul în care ele se infectează. De aceea este bine ca aceste plăgi să fie tratate cu praf de sulfamidă sau de streptomicină pe toată perioada inoculării. În unele cazuri se poate administra şi heparină, care inhibă fenomenul Arthus datorită acţiunii sale antiinflamatorii.

V. RECOLTAREA SÎNGELUI

Pentru a putea urmări dinamica formării anticorpilor în organismul animalelor hiperimunizate, se recoltează, la diferite intervale de timp, cantităţi mici de sînge şi se determină în ser concentraţia anticorpilor. Dacă titrul lor a atins un nivel corespunzător scopului urmărit se trece la recoltarea întregii cantităţi de sînge a animalului (exsanguinizare), din care se separă apoi serul hiperimun.

Sîngerările de control trebuie începute după administrarea primelor 2 doze de antigen. Sîngerarea se efectuează totdeauna scurt timp înainte de injectarea antigenului. Nu se vor sîngera niciodată animalele la primele zile de la inocularea antigenului, deoarece în această perioadă se înregistrează întotdeauna o scădere temporară a concentraţiei anticorpilor circulanţi (faza negativă de producere a anticorpilor). Această scădere

este provocată de fixarea anticorpilor existenţi de către antigenul nou introdus, ceeace micşorează cantitatea lor din ser. Exsanguinizarea se practică deobicei la 7—12 zile după ultima inoculare. Dacă animalul are tendinţa de a menţine un timp îndelungat anticorpii la un nivel ridicat, este de multe ori mai bine ca exsanguinizarea să se înlocuiască cu luări repetate de sînge. În acest fel, animalele pot furniza o cantitate mai mare de antiser. Cantitatea maximă de sînge care poate fi recoltată fără a periclita viaţa animalului, ca şi volumul sanguin total depind de specia folosită şi de greutatea corporală individuală (tabelul nr. 23).

TABELUL NR. 23

Date ajutătoare pentru efectuarea recoltărilor de control şi pentru exsanguinizarea animalelor

Specia	Greutatea corporală (g)	Volumul sanguin total (ml)	Volumul maxim* recoltabil (ml)
Iepure	2 000—2 500	75— 80	25—35
	3 500	100—110	30—40
Cobai	400— 500	25— 35	10—15
Şobolan	200— 300	10— 15	5—10
Şoarece	30	3— 4	0,5— 1
Găina	2 000	60— 80	20—25

* Volumul maxim recoltabil = cantitatea maximă de sînge care poate fi recoltată o dată pe săptămînă, fără a se periclita viaţa animalului.

Recoltarea sîngelui de la animalele de experienţă comportă două aspecte diferite, ambele de aceeaşi importanţă : contenţia animalelor şi tehnica de recoltare.

1. Contenţia animalelor şi dispozitivele uzuale de contenţie (61)

Contenţia animalelor este de două feluri : manuală şi cu ajutorul aparatelor. Pentru inocularea animalelor pentru recoltarea cantităţilor mici de sînge este suficientă contenţia manuală. Ea a fost descrisă la paragraful consacrat tehnicilor de inoculare.

Dispozitivele de contenţie diferă după animalul folosit şi după natura experienţei. Şoarecii şi şobolanii sînt contenţionaţi într-un cilindru sau într-o cutie metalică care lasă coada animalului liberă. Pentru recoltări de sînge din vena auriculară a iepurelui se poate folosi un dispozitiv simplu, de forma unei cutii. Cutia de contenţie este alcătuită din două părţi care se suprapun şi care au la unul din capete o adîncitură care permite fixarea capului animalului. Un aparat mai perfecţionat pentru contenţionarea iepurilor şi a cobailor este masa de operaţie Latapie

Scanned with OKEN Scanner

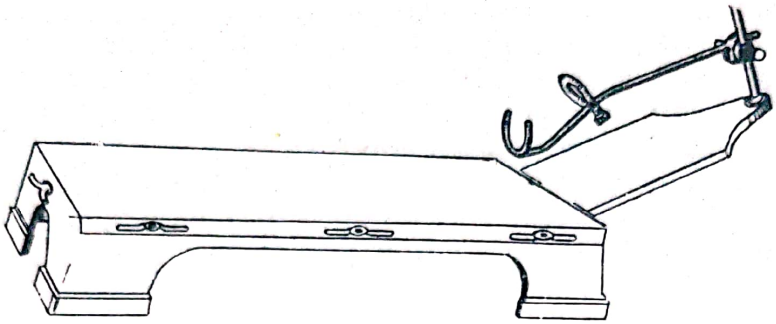


Fig. 53. — Masă de contenție tip Latapie.

(fig. 53). Masa este formată dintr-o planșetă de lemn de formă dreptunghiulară. La părțile ei laterale sînt atașate furci metalice (inele) care permit fixarea membrelor anterioare și posterioare ale animalului. La unul din capetele mesei se găsește un jug metalic prevăzut cu un cursor, pe care este fixat un inel. Contenționarea animalului în decubit dorsal se realizează astfel : se prinde fiecare picior într-un laț, și se răstoarnă animalul în poziție dorsală. Se fixează picioarele de furcile (inelele) laterale ale mesei. Capul animalului se așează în jug și inelul se împinge astfel ca botul să intre complet în interiorul său. În acest fel capul animalului este imobilizat.

2. Recoltarea cantităților mici de sînge

Pentru recoltarea cantităților mici se pot folosi oricare din tehnicile de inoculare intravenoasă descrise în paragraful precedent. La recoltarea sîngelui din vena externă a urechii de iepure acul trebuie introdus cît mai aproape de baza urechii. La fel, vena din coada șoarecelui sau șobolanului trebuie puncționată cît mai aproape de rădăcină. Prize mici de sînge se pot lua printr-o tehnică simplă de secționare a venei urechii (la iepuri) sau de tăiere a vîrfului cozii (șoarece și șobolan). Hemostaza se realizează în primul caz comprimînd zona secționată cu un tampon de vată înmuiat într-o soluție de clorură ferică, iar la coadă cauterizînd plaga cu ajutorul unei spatule înroșite.

Cantități mici de sînge pot fi obținute la cobai, șobolani și șoareci din plexul venos retroorbital (58)(81). Animalul se imobilizează și capul se fixează între degetele mare și arătător ale mîinii stîngi. Se ia o pipetă Pasteur cu marginile rotunjite și se înmoaie în anticoagulant. Se introduce sub un unghi de 45°, cu o ușoară mișcare de rotație în marginea ochiului, cît mai aproape de nas. Se împinge pipeta pînă pătrunde în spatele globului ocular. Se continuă împingerea pînă se simte că pipeta scapă în gol. În acest moment se retrage pipeta încet, pînă cînd în ea pătrunde, prin capilaritate, un jet de sînge. Se pot obține 0,25 ml de sînge

Scanned with OKEN Scanner

de la şoarece şi 1 ml de la şobolan sau cobai. Dacă presiunea sîngelui este slabă, ea se măreşte prin comprimarea venei jugulare cu degetul mare al mîinii stîngi. Pipeta nu trebuie introdusă prin piele sau muşchi deoarece rămîne blocată. Dacă lumenul pipetei este prea larg se pot produce hemoragii nazale.

3. Exsanguinizarea (30) (61)

Pentru exsanguinizarea şoarecelui, şobolanului şi cobaiului se practică puncţia cardiacă. Ea poate fi folosită şi la iepuri pentru recoltarea unor cantităţi însemnate de sînge (20—30 ml).

La efectuarea exsanguinizării animalele trebuie să fie ţinute nemîncate (à jeune) cel puţin 12 ore înaintea intervenţiei. În acest fel se evită lactescenţa serului care apare uneori postprandial. Acul şi seringa trebuie sterilizate în prealabil dacă sîngele recoltat urmează să fie păstrat mai mult timp.

Puncţia cardiacă

Tehnica la şoarece. Se imobilizează animalul pe o planşetă de plută, cu abdomenul în sus, picioarele fiind fixate cu ace de gămălie. Se îndepărtează părul din regiunea cardiacă, se dezinfectează pielea. Se palpează cu degetul arătător locul unde inima loveşte peretele toracelui. La 0,5 cm deasupra acestui loc, în partea stîngă a sternului se introduce perpendicular un ac cu diametrul de 0,5 mm. Se împinge şi se retrage încet acul pînă ce se atinge ventriculul drept. Cînd apare sîngele se montează seringa şi se recoltează cantitatea dorită.

Tehnica la şobolan. Animalul se fixează de planşetă în mod asemănător ca la şoarece. În plus, se trece o sfoară sub incisivii superiori şi se fixează capul animalului în extensie. Se îndepărtează părul din regiunea cardiacă, se dezinfectează pielea şi se reperează vîrful inimii. La 1 cm deasupra acestui loc, la 1—2 mm de bordul stîng al sternului se face o puncţie perpendiculară cu un ac de 0,6 mm diametru. În continuare se procedează ca la şoarece.

Tehnica la cobai. Animalul se contenţionează pe o masă de tip Latapie, de dimensiuni mai mici. Se îndepărtează părul din regiunea stîngă a toracelui şi se dezinfectează pielea. Punctul de introducere a acului se află la nivelul celui de-al doilea spaţiu intercostal stîng, la 2 mm de bordul stîng al sternului şi la 1—1,5 cm deasupra unghiului condroxifoid (fig. 54). Acul cu un diametru de 0,6 mm se introduce perpendicular, printr-o mişcare bruscă în cavitatea toracică. Cîteva mişcări ale acului în sus şi în jos introduc acul în ventriculul drept al animalului. În rest se procedează ca la şoareci.

Tehnica la iepure. Puncţia cardiacă se aseamănă cu aceea folosită la cobai. Locul de introducere a acului este în al treilea spaţiu intercostal stîng, la jumătatea distanţei dintre apendicele xifoid şi baza sternului, la 3—4 mm de bordul stîng al sternului (fig. 54).

Puncţia cardiacă la şoarece, la şobolan şi la cobai poate fi efectuată şi prin contenţionarea manuală a animalelor. Dacă în cursul efectuării puncţiilor apar bule de aer sau lichid seros sanguinolent înseamnă că acul a trecut prin inimă şi a ajuns la plămîni. După cîteva încercări nereuşite animalul trebuie lăsat cîteva ore în repaus şi apoi operaţia poate fi reluată.

Scanned with OKEN Scanner

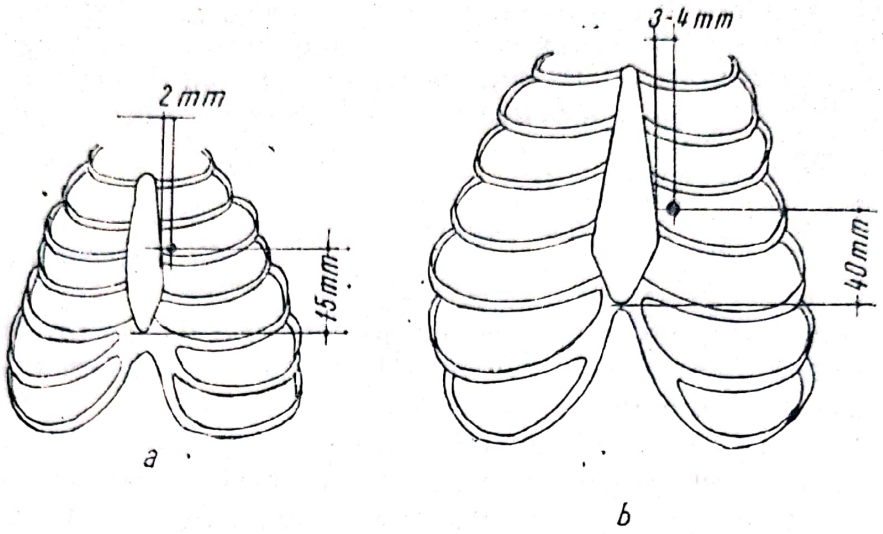


Fig. 54. — Determinarea locului de puncţionare a cordului. a, cobai; b, iepure.

PUNCŢIA ARTERIALĂ

Exsanguinizarea se realizează prin puncţie arterială numai la iepuri, la care nu se poate recolta întreaga cantitate de sînge prin puncţie cardiacă. Exsanguinizarea animalelor necesită o intervenţie chirurgicală pentru punerea în evidenţă a arterei carotide şi puncţionarea ei.

Animalul se anesteziază prin inhalaţie de eter cu ajutorul unui tampon îmbibat cu eter, care se ţine într-un cornet de hîrtie, în faţa botului. Controlul stării de anestezie se face prin urmărirea pupilei la început uşor dilatată şi apoi în timpul anesteziei, contractată. Abolirea reflexului palpebral indică o bună anestezie. Iepurele mai poate fi anesteziat cu 20—30 mg de morfină clorhidrică, administrată subcutanat, sau cu uretan (2 g/kg corp), administrat intravenos sau intraperitoneal.

Instrumentarul chirurgical de intervenţie nu trebuie să fie în mod obligator steril, deoarece animalele sînt sacrificate. Recoltarea sîngelui trebuie în schimb efectuată în vase de recoltare sterile. Un model simplu al unui vas de recoltare sterilă care poate fi realizat uşor în orice laborator este prezentat în figura 55.

Se foloseşte un cilindru gradat de 200—250 ml. În acest vas se introduce o baghetă de sticlă, avînd fixată pe ea o serie de şicane de cauciuc. Acestea se confecţionează tăind un tub de cauciuc în bucăţi mici de 2-3 cm. Bucăţile se taie în lung, se face un orificiu în mijloc şi se înşiră pe bagheta de sticlă. Bucăţile de cauciuc fixează cheagul sanguin după exprimarea serului. În cilindrul gradat se introduce de asemenea un tub de sticlă, care este fixat, prin intermediul unui tub de cauciuc, la un ac de seringă de 0,8 mm diametru. Acul este fixat prin intermediul unui dop de vată într-o eprubetă. Tubul de sticlă şi bagheta cu şicane de cauciuc sînt de asemenea fixate în gura cilindrului cu ajutorul unui dop de vată. Înainte de folosire întreg dispozitivul se învelește cu hîrtie şi se sterilizează la autoclavă timp de 30 min la 120°C.

Tehnica. Iepurele se contenţionează pe masa Latapie, în decubit dorsal. Se tunde părul din regiunea anterioară a gîtului şi se dezinfectează pielea. După anestezie se face o incizie

a pielii lungă de 7—8 cm pe linia mediană, cu bisturiul sau cu o foarfecă dreaptă. Se incizează apoi aponevroza cervicală superficială. Operaţia trebuie făcută cu grijă, deoarece pot fi provocate hemoragii prin lezarea ramurilor arterei jugulare superficiale. Cu ajutorul unei sonde canelate se disociază fasciculele muşchilor anteriori ai gîtului pînă cînd apare traheea. De o parte şi de alta a traheei, în profunzime, se găseşte pachetul vasculonervos, format din artera carotidă, vagul şi nervii simpatici (fig. 56). Indiciul cel mai sigur că vasul căutat este artera se obţine prin palpare, cînd se simt cu uşurinţă pulsaţiile.

Artera carotidă se disociază cu sonda canelată pe o distanţă de 4—5 cm şi se ridică pe sondă. Se taie apoi două fire de aţă, lungi de 20 cm şi se aşază sub arteră, astfel : un prim fir se trece sub extremitatea superioară, cît mai aproape de capul animalului, şi se face nod pentru întreruperea circulaţiei sanguine. Al doilea fir se trece sub extremitatea inferioară, spre baza gîtului, şi se face un nod slab. Dacă se perforează artera sau se rupe se strînge imediat acest nod şi se previne astfel hemoragia.

Se scoate apoi sonda canelată şi se introduce sub arteră degetul arătător al mîinii stîngi, reţinînd artera pe pulpa degetului. Se dezinfectează artera cu alcool. Se introduce acul în arteră, în sens invers circulaţiei sanguine (de la cap spre gît). Operaţia trebuie efectuată cu calm şi hotărîre pentru a nu traversa artera şi a declanşa o hemoragie. Dacă s-a produs totuşi, hemoragia se opreşte prin strîngerea nodului şi apoi se abordează cealaltă ramură a arterei carotide

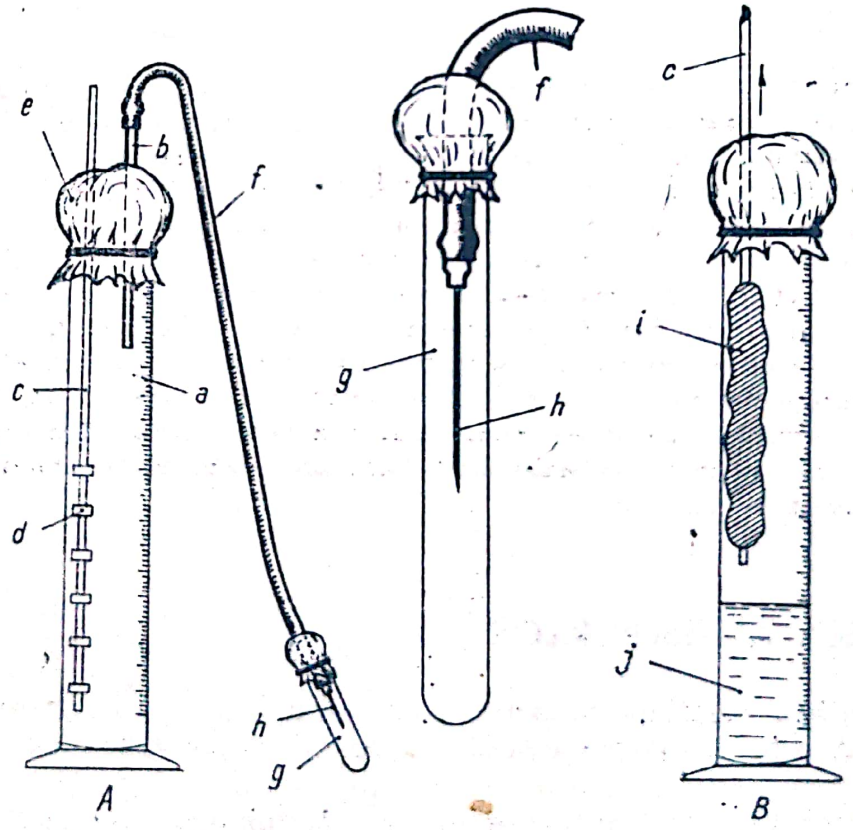


Fig. 55. — Vas pentru recoltare sterilă. A, Înainte de recoltare ; B, după recoltare.

a, Cilindru gradat ; *b*, tub de sticlă ; *c*, baghetă de sticlă ; *d*, şicane de cauciuc ; *e*, dop de vată ; *f*, tub de cauciuc ; *g*, eprubetă ; *h*, ac de seringă ; *i*, cheag de sînge ; *j*, ser sanguin.

Scanned with OKEN Scanner

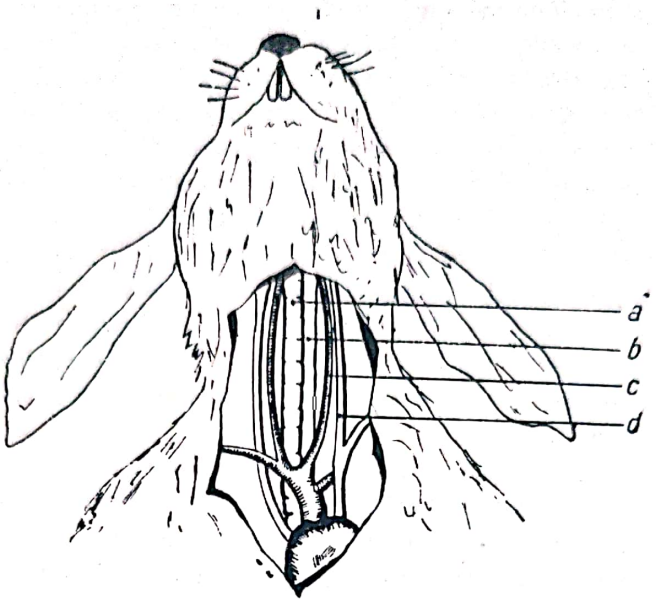


Fig. 56.—Zona de abordare a arterei carotide la iepure.
a, Trahea; *b*, esofagul; *c*, artera carotidă; *d*, vena jugulară.

printr-un procedeu asemănător. Sîngele se scurge apoi în vasul de recoltare. Cînd debitul sîngelui scade, se recomandă ridicarea părţii posterioare a animalului prin înclinarea mesei de contenţie şi masarea inimii. În momentul în care sîngele nu se mai scurge, se scoate tubul de sticlă din cilindrul gradat şi acul din arteră. Orificiul rămas în dopul de vată în urma extragerii tubului de sticlă se închide prin comprimarea dopului. Se ţine vasul în termostat la 37°C timp de 2—3 ore. Se ridică bagheta, scoţînd cheagul de sînge din serul exprimat (fig. 55), şi vasul este lăsat la frigider încă 12—24 de ore. Se îndepărtează bagheta cu cheagul şi antiserul se transvazează prin manipulări sterile în vasele în care va fi păstrat.

Accidentul cel mai frecvent care se produce la recoltare este hemoliza sîngelui. De obicei, hemoliza apare cînd vasul de recoltare, acul sau seringa nu sînt perfect uscate. De asemenea şi în cazul recoltărilor care reuşesc numai după numeroase încercări. Hemoliza sîngelui nu împiedică folosirea lui în analiza imunochimică totuşi este recomandabilă evitarea acestui accident prin manipulări corecte.

VI. PĂSTRAREA ANTISERURILOR

Condiţia esenţială pentru ca antiserurile să se păstreze un timp îndelungat este recoltarea sterilă a sîngelui şi păstrarea lor în condiţii sterile.

Sterilitatea antiserurilor se asigură efectuînd o coagulare în condiţii sterile şi apoi repartizînd serul exprimat în fiole, prin manipulări sterile. Separarea cheagului de ser se poate efectua şi printr-o centrifugare sterilă de 15 min la 3 000 g, însă şansele de a infecta antiserul sînt mai mari.

Scanned with OKEN Scanner

Serul exprimat în vasul de recoltare se transvazează steril în mai multe eprubete sterile, cu o capacitate de 20—30 ml. Dacă în cursul transvazării se antrenează un număr mic de globule roşii de pe fundul vasului, se lasă eprubetele în frigider încă 24 de ore. Cu ajutorul unor pipete Pasteur sterile, antiserul din eprubete se repartizează apoi în fiole sterile cu o capacitate de 5 ml, care se închid la flacără, se numerotează şi se păstrează în frigider (4°C).

Dacă în cursul operaţiunilor de obţinere antiserul s-a infectat, el poate fi sterilizat fie prin filtrare peste filtre Seitz sau Berkefeld, fie prin adăugarea antisepticelor. În scopuri imunochimice se folosesc cu succes mertiolatul (etilmercuritiosalicilatul de sodiu) în concentraţie de 1 : 5 000 — 1 : 10 000, azida de sodiu în concentraţie de 0,1% sau fenolul în concentraţie de 1%. Nici una din aceste substanţe nu impietează asupra calităţilor imunochimice ale antiserului. Doar fenolul este folosit mai rar, deoarece provoacă depunerea unui sediment în antiser şi îi conferă acestuia o activitate anticomplimentară. Antiserurile cu adaos de antiseptice se păstrează de asemenea la frigider. Unii autori preferă să adauge antiseptice chiar la serurile hiperimune care au fost recoltate steril.

Antiserurile mai pot fi păstrate şi în stare îngheţată (—15°C), introducîndu-le în corpul de răcire al frigiderelor obişnuite. De asemenea ele pot fi liofilizate. Ultimul procedeu se aplică numai după un control prealabil, deoarece liofilizarea poate provoca uneori inactivarea antiserurilor. Antiserurile lactescente recoltate de la animale care nu au fost ţinute nemîncate, depun în timp un sediment. Aceste antiseruri îşi conservă activitatea un timp mai scurt, ceea ce arată că în depozitul format poate fi antrenată şi o parte din anticorpi.

Capacitatea antiserurilor de a reacţiona cu antigenul folosit la imunizare scade în timp. De aceea, periodic, experimentatorul trebuie să verifice titrul acestor seruri. Cînd titrul scade la mai mult de jumătate din valoarea iniţială, antiserurile se îndepărtează. De obicei, un antiser corect preparat, ţinut fără întrerupere la frigider (4°C), poate fi folosit cu succes cel puţin 6 luni. Fac excepţie de la această regulă antiserurile de şoarece care se alterează repede dacă sînt păstrate neînghețate (26).

Bibliografie

1. Acred P., Brown D. M., Hardy T. L. a. Mansford K. R. L., Nature, 1963, **199**, 758.
2. Adler J. M., J. Immunol., 1956, **76**, 217.
3. Aitken I. D. a. Mulligan W., Immunology, 1962, **5**, 295.
4. Akcasu A., Int. Arch. Allergy, 1960, **22**, 123.
5. Albright J. H., Makinodan T. a. Carter R. R., Fed. Proc., 1963, **22**, 266.
6. Alvord E. C., *Allergic encephalomyelitis*, Thomas Springfield, 1959, 518.
7. Alvord E. C., Shaw C. M. a. Kies M. W., 46 Ann. meeting Atlantic City, New Jersey, 1962, Federation Proc., 1962, **21**, 276.
8. Anacker R. L. a. Munoz J., J. Immunol., 1961, **87**, 426.

Scanned with OKEN Scanner

9. Askonas B. A., White R. G. a. Wilkinson P. C., Immunochem., 1965, **2**, 329.
10. Asselineau J., Choucroun N. et Lederer E., Biochim. Biophys. Acta, 1950, **5**, 197.
11. Bauer D. C. a. Stavitsky A. B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, **47**, 1 667.
12. Baumgartner L., J. Immunol., 1934, **27**, 407.
13. — J. Immunol., 1934, **27**, 417.
14. Benacerraf B., Ovary Z., Block K. J. a. Franklin E. C., J. Exp. Med., 1963, **117** 937.
15. Benedict A. A., Brown R. J. a. Ayengar R., J. Exp. Med., 1962, **115**, 195.
16. Benedict A. A., Larson C. a. Nik-Khah H., Science, 1963, **139**, 1 302.
17. Berlin B. S., J. Immunol., 1960, **85**, 81.
18. — Ann. Allergy, 1963, **21**, 82.
19. Borel Y., Fauconnet M. a. Mitscher P. A., J. Exp. Med., 1965, **122**, 263.
20. Boyd W. C., *Fundamentals of Immunology*, Intersci., New Yoork, 1956.
21. Brent L., Progr. Allergy, 1958, **5**, 271.
22. Chen C. C., Grossberg A. C. a. Pressman D., Biochemistry, 1962, **1**, 1 025.
23. Cheng-Mei Shaw, Alvord E. C. a. Kies M. W., Immunol., 1964, **92**, 24.
24. Choucroun N., Amer. Rev. Tuberc., 1947, **56**, 203.
25. Covalevschi C. L., *Îngrijirea animalelor mici de laborator*, Edit. de stat, Bucureşti, 1952.
26. Crowle A., *Immunodiffusion*, Acad. Press, New York, 1960.
27. Davenport F. M., Hennessy A. V. a. Francis I. Jr., J. Exp. Med., 1953, **98**, 641.
28. Dixon F. J., Maurer P. H. a. Deichmiller M. P., J. Immunol., 1954, **72**, 179.
29. Dresser D. W., Immunology, 1962, **5**, 161.
30. Dumas J., *Les animaux de laboratoire*, Flammarion, Paris, 1953.
31. Epp M., Canad. J. Publ. Health, 1962, **53**, 79.
32. Farris E. J., *The care and breeding of laboratory animals*, Wiley and Sons, New York, 1955.
33. Faure M., Lamy R. et Coulon M. J., Ann. Inst. Pasteur, 1948, **74**, 19.
34. Finger H., Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1961, **121**, 291.
35. — Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1962, **122**, 15.
36. Fink A. W. a. Quinn V. A., J. Immunol., 1953, **70**, 61.
37. Fischel E. E., Kabat E. A., Stoerck H. C. a. Bezer A. E., J. Immunol., 1952, **69**, 611.
38. Freund J., Ann. Rev. Microbiol., 1947, **1**, 291.
39. — Am. J. Clin. Pathol., 1951, **21**, 645.
40. — Adv. Tuberc. Res., 1956, **7**, 130.
41. Freund J., Casals J. a. Hosmer E. P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1937, **37**, 509.
42. Freund J. a. Mc Dermott K., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1942, **49**, 548.
43. Frick E., Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1950, **107**, 411.
44. Gell P. G. H. a. Benacerraf B., Adv. Immunol., 1961, **1**, 319.
45. Gell P. G. H. a. Coombs B. R. A., *Clinical aspects of immunology*, Blackwell Sci. Oxford, 1963.
46. Gengosian N., Makinodan T. a. Carter R. R., J. Immunol., 1962, **88**, 426.
47. Georgescu V. şi Bogdan E., An. Inst. de patol. şi ig. anim., 1950, **2**, 128.
48. Gilden R. V. a. Rosenquist G. L., Nature, 1963, **199**, 87.
49. Glover T. D. a. Bishop D. W., Nature, 1963, **198**, 901.
50. Good R. A., Condie R. M. a. Bridges R. A., în *Mechanism of antibody formation*, Publ. House Czech. Acad. Sci., Praga, 1960, 118.
51. Goret P., Ann. Inst. Pasteur, 1945, **72**, 53.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL VII-LEA. IZOLAREA ŞI CARACTERIZAREA ANTICORPILOR

ANTISERURILE conţin alături de anticorpii învestiţi cu specificitatea dorită de experimentator şi alte substanţe proteice de balast, ca : anticorpi cu alte specificităţi, γ-globuline şi celelalte fracţiuni proteice care se găsesc în mod normal în ser. Analiza imunochimică se aplică de multe ori cu un succes sporit dacă în locul antiserurilor se folosesc doar anticorpii cuprinşi în acestea. Îndepărtarea substanţelor de balast existente în antiseruri creşte uneori specificitatea şi intensitatea reacţiilor imune, de aceea, fără a fi strict necesară, această operaţie este totuşi recomandabilă în numeroase împrejurări. De exemplu, coloraţiile imunofluorescente sînt mai specifice dacă se folosesc anticorpi fluorescenţi izolaţi şi nu antiseruri fluorescente. Această constatare este valabilă şi pentru tehnicile care folosesc anticorpi marcaţi cu izotopi radioactivi.

Izolarea anticorpilor din antiseruri se poate realiza prin două căi : *metode nespecifice*, care implică separarea anticorpilor de celelalte proteine serice pe baza proprietăţilor lor fizico-chimice ; şi *metode specifice*, care se bazează pe extragerea anticorpilor din amestecul proteinelor serice cu ajutorul antigenului corespunzător, prin reacţia de imunoprecipitare.

Metodele nespecifice separă anticorpii împreună cu γ-globulinele de celelalte fracţiuni proteice ale antiserului. În majoritatea cazurilor, prin aceste metode anticorpii nu pot fi separaţi de γ-globulinele serice lipsite de activitate imunologică.

Metodele specifice asigură o purificare mai mare a anticorpilor. Ele permit atît separarea anticorpilor de γ-globulinele serice, cît şi separarea anticorpilor între ei, în raport cu specificitatea imunologică înscrisă în molecula lor.

Metodele nespecifice nu permit o purificare atît de înaintată a anticorpilor ca metodele specifice, în schimb izolează anticorpii cu un randament mai mare. Astfel, cu ajutorul metodelor nespecifice se obţin în mod obişnuit pînă la 80-90 % din totalul anticorpilor cuprinşi în antiser, în timp ce recuperări numai de 25-40 % sînt frecvent întîlnite prin aplicarea metodelor specifice. Metodele nespecifice sînt mai frecvent folosite la izolarea anticorpilor, deoarece sînt mai puţin laborioase decît cele specifice.

Alegerea metodei de izolare se face în raport cu obiectivul cercetării întreprinse. Dacă substanţele proteice care afectează cercetarea imunochimică au proprietăţi fizico-chimice diferite de cele ale anticorpilor,

este suficientă aplicarea unei metode nespecifice de izolare a anticorpilor. Numai dacă coexistența în antiser a mai multor tipuri de anticorpi cu specificități distincte este incompatibilă cu desfășurarea corectă a analizei, trebuie să se recurgă la metode specifice care izolează numai anticorpii doriți. De asemenea, studiul structurii chimice și antigenice a anticorpilor, precum și aprofundarea mecanismului reacției anticorpului cu antigenul pot fi realizate numai cu preparate de anticorpi de o înaltă puritate.

Antiserurile, în care concentrația anticorpilor este joasă, nu pot fi folosite cu succes în analiza imunochimică decît după izolarea anticorpilor și reluarea lor într-un volum minim de soluție salină fiziologică. Se ridică astfel concentrația anticorpilor la un nivel care permite efectuarea satisfăcătoare a analizei. În aceste cazuri se utilizează metode nespecifice de izolare.

Prin hiperimunizarea animalelor cu un amestec complex de antigene se obțin antiseruri polispecifice, capabile să reacționeze cu toate sau cu majoritatea antigenelor care compun amestecul injectat. Antiserurile polispecifice se folosesc mai ales pentru controlarea purității unui preparat antigenic (vezi p. 122).

În majoritatea cazurilor, în analiza imunochimică se întrebuințează antiseruri cu specificitate îngustă, capabile să reacționeze numai cu antigenul studiat sau cu un număr redus de antigene înrudite. Obținerea antiserurilor monospecifice depinde, în primul rînd, de posibilitatea preparării antigenului într-o stare de înaltă puritate. Injectarea unui preparat antigenic alcătuit numai din molecule de același fel declanșează formarea anticorpilor capabili să reacționeze numai cu acest antigen, deci antiserurile vor fi monospecifice.

Preparatele antigenice sînt însă de multe ori impurificate, cu urme din alte substanțe, capabile și ele să determine formarea anticorpilor. În mod corespunzător, antiserurile vor conține, alături de anticorpi față de antigenul principal și anticorpi față de impurități. Cum formarea anticorpilor nu este proporțională cu cantitatea antigenelor injectate, se poate ca în aceaste antiseruri, anticorpii față de impurități să fie în cantitate la fel de mare cu anticorpii față de antigenul principal. Dacă anticorpii față de impurități perturbează reacția imună principală, ei pot fi îndepărtați adăugînd peste antiser cantități determinate din impuritățile respective. Anticorpii reacționează cu impuritățile formînd un precipitat imun, care se îndepărtează. În acest fel antiserul s-a eliberat de anticorpii perturbanți, devenind monospecific. Operația de îngustare a specificității antiserurilor se numește *absorbție* sau, mai rar *epuizare* sau *despecifiere*.

Absorbția antiserurilor se realizează printr-un procedeu invers celui de izolare a anticorpilor prin metode specifice. În timp ce metodele specifice de izolare extrag din antiser numai anticorpii doriți, absorbția îndepărtează din antiser anticorpii indezirabili. Antiserurile absorbite conțin, desigur, alături de anticorpi, și celelalte fracțiuni proteice ale serului (inclusiv γ-globulinele). Realizate pe două căi diferite, ambele procedee concură

la obţinerea preparatelor cu specificitate îngustă, necesare în analiza imunochimică.

Pentru caracterizarea anticorpilor este în primul rînd necesară obţinerea lor într-o stare cît mai pură. Abia după ce anticorpul a fost izolat şi purificat, se pot începe cercetări privind structura şi compoziţia sa chimică, proprietăţile fizico-chimice sau specificitatea imunologică. Aceste cercetări se realizează prin tehnicile fizico-chimice curente, asociate cu anumite operaţii particulare, cum ar fi: hidroliza enzimatică a anticorpilor, desfacerea lanţurilor polipeptidice etc.

Caracterizarea anticorpilor contribuie la cunoaşterea mai aprofundată a naturii lor chimice, fizice şi imunochimice, permiţînd totodată experimentatorului să verifice eficienţa procedeelor de izolare a anticorpilor.

I. IZOLAREA ANTICORPILOR PRIN METODE FIZICO-CHIMICE (NESPECIFICE)

Metodele nespecifice reunesc toate procedeele de obţinere a anticorpilor, bazate pe fracţionări chimice şi fizico-chimice, care sînt comune tuturor substanţelor proteice. Deoarece anticorpii apar în fracţiunea γ-globulinică a serului, metodele nespecifice de izolare a lor se confundă cu acelea de obţinere a γ-globulinelor. Cum serul mamiferelor conţine trei clase principale de γ-globuline (vezi p. 159), în care au putut fi detectaţi anticorpii, metodele nespecifice trebuie să urmărească numai izolarea fracţiunilor γ-globulinice care posedă activitate de anticorp. Metodele nespecifice nu sînt capabile să separe anticorpii de γ-globulinele neimune existente în antiser, de aceea, preparatele vor conţine întotdeauna şi o anumită cantitate de γ-globuline de balast, neparticipante la reacţia imună. Cantitatea de anticorpi prezentă în preparatele de γ-globulină obţinute prin metode nespecifice variază în raport cu concentraţia lor iniţială în antiser. În general, procentul anticorpilor în preparatele totale de γ-globulină variază între 20 şi 70%. Prezenţa γ-globulinelor neimune poate masca unele particularităţi caracteristice anticorpilor, de aceea aceste preparate pot fi utilizate numai dacă eventualele impurităţi nu împiedică cercetările propuse. De obicei, ele se folosesc în vederea creşterii specificităţii şi intensităţii reacţiilor imune, care stau la baza unor metode de analiză imunochimică.

Metodele nespecifice, care permit izolarea rapidă şi eficientă a anticorpilor, sînt: precipitarea cu săruri minerale, substanţe organice sau solvenţi organici, electroforeza preparativă, filtrare prin gel şi cromatografie pe schimbători de ioni.

Preparatele de anticorpi obţinute prin precipitare sînt impurificate de obicei şi cu alte fracţiuni proteice ale serului, în afară γ-globulinelor. Eliminarea impurităţilor se realizează numai prin precipitări repetate care prelungesc durata experimentului şi micşorează randamentul.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda filtrării prin gel permite separarea γG-globulinelor de γM-globuline, de aceea ea poate fi întrebuinţată la izolarea anticorpilor localizaţi în aceste două fracţiuni. Anticorpii izolaţi prin acest procedeu sînt însă impurificaţi cu diferite fracţiuni proteice ale antiserului.

Electroforeza preparativă şi cromatografia pe schimbători de ioni furnizează preparatele cele mai pure de anticorpi. Aceste metode pot îndepărta toate fracţiunile proteice ale antiserului, inclusiv clasele de γ-globuline care nu posedă activitate imunologică. Preparatele rămîn, desigur, impurificate cu tipul de γ-globulină de care aparţine anticorpul izolat.

Izolarea anticorpilor poate fi realizată şi prin aplicarea succesivă a două din procedeele indicate mai sus. Astfel, anticorpii pot fi separaţi prin precipitare şi apoi, în locul reprecipitărilor de lungă durată, ei pot fi purificaţi prin cromatografie pe schimbători de ioni sau filtrare prin gel. Asocierea metodei de precipitare cu cea cromatografică permite prelucrarea unor cantităţi mari de antiser, fără a necesita construirea unor coloane cromatografice mari (191).

La sfîrşitul operaţiilor de izolare, experimentatorul trebuie să controleze randamentul preparării şi felul în care s-au păstrat proprietăţile imunologice ale anticorpilor. Randamentul se calculează raportînd cantitatea anticorpilor în preparatul final la cantitatea lor iniţială în antiser. Randamente mai mici de 70% arată, în general, pierderi de substanţă activă. Pentru determinarea concentraţiei anticorpilor este recomandabilă aplicarea unei metode precise, cantitative (vezi cap. IX).

Alterarea proprietăţilor imunologice ale anticorpilor izolaţi poate surveni accidental sau prin aplicarea incorectă a metodelor de izolare. Controlul păstrării activităţii imunologice în preparatul final se face prin testarea capacităţii de reacţie a anticorpilor cu antigenul omolog. Testarea se efectuează prin una din metodele de imunoprecipitare în mediu lichid sau gelificat. Capacitatea de reacţie a preparatului comparată cu cea a antiserului dă indicaţii asupra intensităţii alterărilor suferite în cursul izolării.

Descrierea metodelor de separare este făcută, sub aspectul lor general, în capitolul al II-lea al cărţii. În acest paragraf sînt detaliate condiţiile particulare în care se aplică aceste metode la izolarea anticorpilor.

1. Precipitarea

Metodele de precipitare separă anticorpii de celelalte proteine serice pe baza diferenţelor de solubilitate. Se folosesc curent ca agenţi de precipitare sărurile minerale (sulfatul de amoniu şi sulfatul de sodiu), solvenţi organici (etanolul şi metanolul) şi unele substanţe organice (rivanolul). Separarea anticorpilor cu rivanol, spre deosebire de celelalte metode care precipită γ-globulinele, se realizează prin precipitarea tuturor substanţelor proteice din ser sau din plasmă, cu excepţia γ-globulinelor care rămîn în soluţie.

Scanned with OKEN Scanner

Precipitarea cu sulfat de amoniu (156) (129)

Acest procedeu se poate întrebuința la serurile imune de iepure (114). Se măsoară un volum dat V de ser imun, perfect limpede. Se răcește serul la 0°C și peste el se adaugă un volum (V/2) de soluție saturată de $(NH_4)_2 SO_4$, ajustat în prealabil la pH 7,4 și răcită de asemenea la 0°C. Se agită și după 10 min se centrifughează la rece 15 min la 5 000 g. Precipitatul de γ-globulină se redizolvă prin adăugarea a V ml dintr-o soluție salină fiziologică cu pH-ul ajustat la 7,4. Se repetă precipitarea în condițiile descrise mai sus. În cele din urmă precipitatul se dizolvă în V ml apă distilată și se ajustează pH-ul la 7,4. Dizolvarea precipitatului trebuie să fie totală. Soluția proteică se dializează la rece față de o soluție salină fiziologică de pH 7,4, pînă la îndepărtarea completă a ionului amoniu (reacția cu reactivul Nessler rămîne negativă). Dializa poate fi înlocuită prin filtrarea soluției peste o coloană umplută cu gel de Sephadex G-25 sau G-50.

Preparatul final se păstrează la frigider sau se liofilizează. El poate conține pînă la 5% impurități (α- și β-globuline). Randamentul preparării γ-globulinelor este cuprins între 80 și 90%.

Tehnica de precipitare descrisă mai sus poate fi aplicată și la izolarea γ-globulinelor din antiserurile altor specii de animale (4). Precipitarea se realizează la o concentrație finală în sulfat de amoniu de 34% (1,39 M) și la un pH care oscilează în jur de 7,2. Operațiile pot fi efectuate și la temperatura camerei. Unii autori diluează serul 1 : 2 cu apă distilată înainte de a efectua precipitarea (199).

Precipitarea cu sulfat de sodiu (100)

La un volum dat V de ser uman se adaugă sulfat de sodiu solid, în cantitate de 18 g/100 ml. După 10 min se centrifughează soluția și precipitatul depus se dizolvă în V/2 ml tampon fosfat de pH 8,0 și puterea ionică 0,1. Se adaugă din nou sulfat de sodiu, în cantitate de 12 g/100 ml. Precipitatul format este alcătuit din 95% γ-globulină și numai 5% α- și β-globulină. Redizolvarea precipitatului în V/10 ml tampon și repetarea precipitării, tot la aceeași concentrație de sulfat de sodiu, furnizează un material care conține peste 99% γ-globulină pură (randament 60—70%). Toate operațiile se efectuează la temperatura camerei (25°C)

Precipitarea cu etanol (211)

Se folosește instalația redată în figura 25. Se introduc 25—50 ml de ser de iepure în vasul *a*, iar baia *b* se umple în prealabil cu gheață obișnuită, pentru ca temperatura serului să fie de 0,5—1°C. Se conectează agitatorul magnetic. În pîlnia de separare se toarnă un volum egal de etanol 50% răcit. Manșonul de răcire se umple cu gheață, avînd punctul de topire de —10°C. (vezi. p. 88). Se deschide robinetul și etanolul se picură lent sub agitare energică. Pe măsura adăugării lui, în baia B se scade punctul de topire a gheții la —5°C. În felul acesta se realizează o scădere lentă a temperaturii de la 0° la —5°C. Cînd se adaugă aproximativ jumătate din volumul etanolului, întregul amestec răcitor din baia B trebuie înlocuit cu gheață avînd punctul de topire la —5°C. După adăugarea etanolului, amestecul se lasă pe agitator la temperatura de —5°C timp de o oră, pentru o mai bună formare a precipitatului. Apoi, precipitatul se separă prin centrifugare la rece la 5 000 g timp de 30 min. Precipitatul se dizolvă într-un volum determinat de soluția salină fiziologică și se dializează tot față de această soluție, pentru îndepărtarea urmelor de etanol. În cele din urmă, soluția proteică poate fi liofilizată. Preparatul conține, în afară de γ-globuline, impurități de β-globuline și alte proteine serice.

Scanned with OKEN Scanner

Precipitarea cu etanol furnizează preparate cu o puritate de 95—98% și cu un randament de 50—80%. Nerespectarea indicațiilor privind temperatura precipitărilor, ca și înghețarea probelor în timpul precipitării scade considerabil randamentul preparării. Există și alte procedee de preparare a γ-globulinelor cu un grad de puritate mai avansat, folosind etanolul (26) (135) (25) sau metanolul (157) (28).

Precipitarea cu rivanol (81) (186)

Tehnica constă dintr-o precipitare a albuminelor și a celei mai mari părți din α — și β-globulinele serice de către o soluție apoasă, diluată de rivanol. În supernatant rămîn doar γ-globulinele împreună cu soluția galbenă de rivanol. Aceasta se îndepărtează obișnuit prin adsorbție cu cărbune activ. Soluția decolorată și limpede conține 90% din γ-globulinele inițiale.

Cantitatea maximă de precipitat se obține la un pH în jur de 8,0, precipitarea în domeniul acid păstrînd în soluție cantități însemnate și din celelalte fracțiuni proteice. Creșterea puterii ionice a mediului de reacție duce de asemenea la menținerea în soluție a celorlalte fracțiuni proteice. Dacă la o putere ionică de 0,08 rămîn în soluție numai γ-globulinele, la 0,35 aproape toate proteinele se păstrează în soluție (186) (94).

Reactivi și modul de lucru. a) Soluție apoasă de rivanol 0,4 g%. Soluția se prepară prin adăugarea treptată de mici cantități de rivanol sub agitare, în apă încălzită la 60—70°C. După solvirea întregii cantități de rivanol, se lasă să se răcească soluția la temperatura camerei și apoi se corectează volumul. *b*) Cărbune activ (Norit SX 30 sau alte produse similare).

La un volum de ser sau plasmă se adaugă în porțiuni mici 3,5 volume din soluția apoasă de rivanol 0,4%, agitîndu-se ușor. Se ajustează pH-ul în jur de 8,0. Se formează un precipitat galben alcătuit din albumină, α-și β-globuline, lipoproteine și mucoproteine. Se lasă în repaus amestecul 30 min, după care se centrifughează 15 min la 3 000 g (29). La supernatantul galben se adaugă cărbune activ (10—25 mg/ml). Se agită cîteva min. și apoi se îndepărtează cărbunele prin filtrare sau centrifugare. Trebuie să se obțină un lichid clar și incolor. Din această soluție γ-globulinele pot fi precipitate cu o soluție saturată de sulfat de amoniu (0,8 volume la 1 volum supernatant) (129) sau prin alte procedee de precipitare (127) (128) (135) (185).

Observații. Dacă cantitatea de cărbune este prea mare sau dacă timpul de contact este prea lung, γ-globulinele se obțin cu un randament prea mic. Dacă prin adăugarea cantității maxime de cărbune indicată mai sus soluția nu se decolorează, cărbunele trebuie înlocuit neavînd o calitate corespunzătoare. În unele cazuri se mai pot adăuga cantități mici de cărbune pînă la obținerea unui lichid perfect incolor (29).

Adsorbția rivanolului cu cărbune poate fi înlocuită cu succes prin filtrare peste gel de Sephadex G-25. Eluția se efectuează cu o soluție de clorură de sodiu 0,145 M. Rivanolul rămîne în coloană.

Prin precipitare cu rivanol se izolează 70—90% din cantitatea inițială de γ-globulină. Randamentul depinde de felul în care sînt conduse operațiile și de calitatea rivanolului și a cărbunelui activ.

Puritatea preparatelor variază între 80 și 98%. Serurile bogate în γ-globulină (om, cal) dau rezultate superioare celor mai sărace (iepure). Impuritățile sînt α- și β-globuline. În unele cazuri patologice (mielom, lupus eritematos), preparatele sînt impurificate și cu o anumită cantitate de glicoproteine.

Rivanolul nu modifică proprietățile fizico-chimice ale γ-globulinelor. S-a arătat că γ-globulinele obținute prin acest procedeu nu diferă prin nici o caracteristică fizico-chimică de preparatele obținute prin precipitare cu etanol. Titrul în anticorpi se menține în cazul izolării

Scanned with OKEN Scanner

γ-globulinelor prin rivanol. Studii imunochimice au arătat că proprietăţile antigenice ale γ-globulinelor nu se modifică în cursul separării lor cu rivanol (128) (107).

Metoda se poate aplica şi la obţinerea imunoglobulinelor din lapte şi colostru (99) (121), ceruloplasminei (187), trombinei (124) şi combinaţiilor β_1-globulinelor cu metalele (8).

2. Electroforeza preparativă

Fracţionarea unor volume moderate de antiser (10-20 ml) în scopuri preparative se realizează prin tehnica de electroforeză în zonă. Sînt folosite ca medii de suport mai ales blocul de amidon sau cel de policlorură de vinil, gelurile de agar şi gelurile de agaroză. Metoda este simplă şi permite de obicei obţinerea anticorpurilor cu un randament bun şi într-o stare pură. Unii anticorpi pot fi uneori denaturaţi sau reţinuţi pe suprafaţa particulelor care alcătuiesc blocul (42).

Localizarea anticorpilor în regiunea electroforetică a γ-globulinelor se face prin testarea eluatelor obţinute din fiecare secţiune a blocului sau gelului (110) (fig. 57).

Anticorpii pot fi localizaţi în jumătatea mai rapidă a γ-globulinelor, ei aparţinînd tipului γM sau, în cea lentă, tipului γG. Aceste două tipuri de γ-globuline nu pot fi separate satisfăcător prin electroforeza preparativă, deoarece de cele mai multe ori ele nu sînt bine delimitate una de cealaltă. Anticorpii localizaţi în zona γ A pot fi separaţi satisfăcător de cei din zona

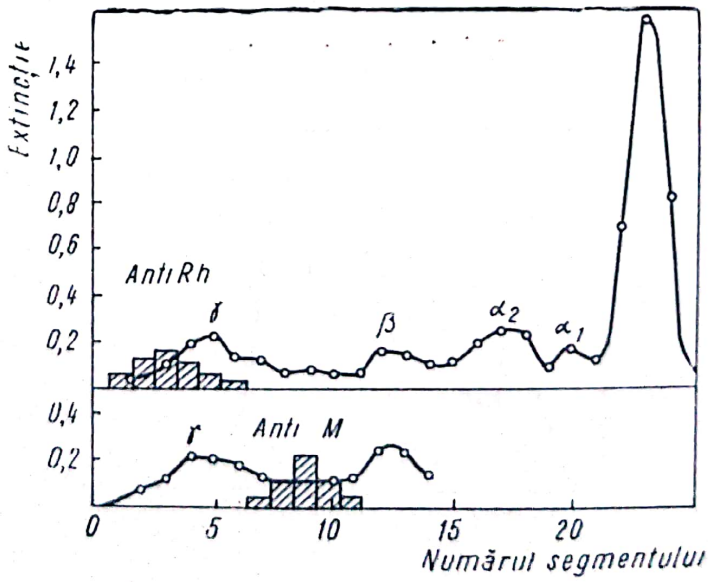


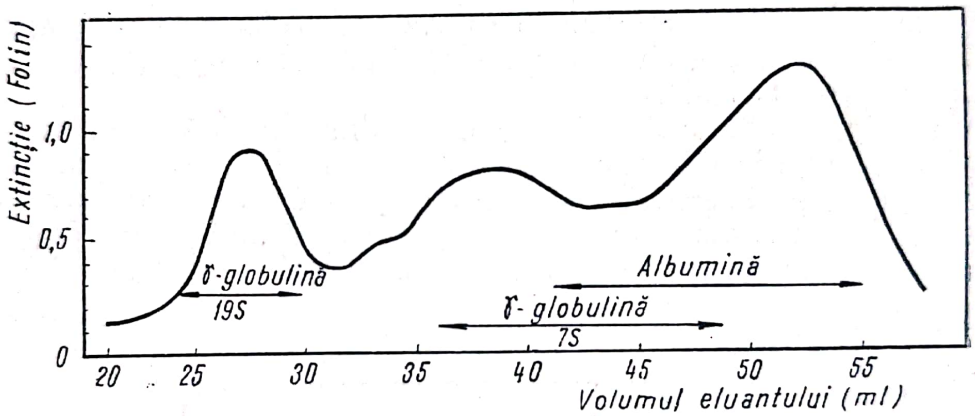
Fig. 57. — Localizarea anticorpilor anti-M şi anti-Rh în diferite regiuni ale fracţiunii γ-globulinice (s-au aplicat două antiseruri diferite, separate simultan pe acelaşi bloc de amidon; tampon veronal-veronal sodic, pH 8,6, $\mu = 0{,}05$ (după H. G. Kunkel şi colab., 1959).

γG, datorită mobilității lor electroforetice diferite (40). De obicei se separă două fracțiuni, una conținînd exclusiv γG, iar cealaltă γA și urme de γG (106). De aceea, în electroforeza preparativă se obțin în mod obișnuit preparate de γ-globulină care trebuie supuse filtrării prin gel sau cromatografiei pe schimbători de ioni pentru separare mai înaintată (40).

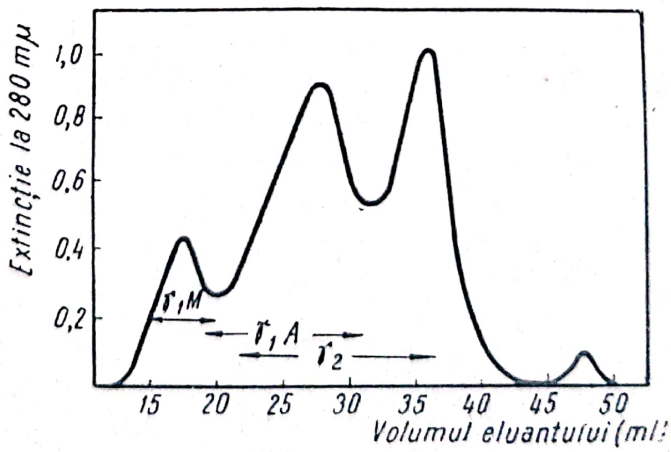
3. Filtrarea prin gel

Serul uman fracționat pe gel de Sephadex G-200 se repartizează în trei componente (fig. 58).

În primul component, alături de γM- globulina s-au identificat α_2-macroglobulina și α- și β-lipoproteinele. Componentul al doilea este



a



b

Fig. 58.—Filtrarea prin gel de Sephadex G-200 a proteinelor serice (după P. Flodin și colab., 1962). a, Elufia cu tampon TRIS 0,1 M, pH 8,0, conținînd 0,2 M NaCl; b, elufia cu tampon borat, pH 8,0, conținînd 0,1 M NaCl.

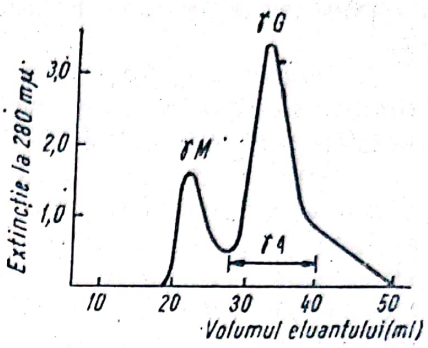


Fig. 59. — Separarea γ-globulinelor γM (19S) și γG (7S) (după J. L. Fahey și colab., 1963). S-a supus filtrării un preparat de γ-globulină obținut prin electroforeză preparativă. Eluția s-a făcut cu tampon TRIS 0,1 M, pH 8,0 conținînd 1,0 M NaCl.

format în cea mai mare parte din γG-globulină, iar albumina și transferina au fost identificate în cel de-al treilea component.

A treia clasă de γ - globulină, γA, se eluează din coloană cu puțin înaintea γG - globulinelor. Distribuția celor trei clase de globuline în cele trei fracțiuni ale serului uman este redată în figura 58, *a*.

Studiile imunochimice și de ultracentrifugare au arătat că anticorpii γM (19S) sînt repartizați în primul pisc, iar anticorpii γG (7S) în cel de-al doilea. Anticorpii intermediari, care se eluează între cei doi componenți, au o constantă de sedimentare cuprinsă între 7 și 15S, fiind alcătuiți în cea mai mare parte din γA - globuline (101) (168).

Prin filtrare pe gel de Sephadex G-200 a unui antiser se separă anticorpii de tip 19S de cei 7S, dar ei nu se eliberează complet de γA - globulină (fig. 58 *b*). Deoarece γA - globulinele se găsesc în mod normal în cantități mici în antiseruri, ele se obțin puternic impurificate cu celelalte fracțiuni proteice cu care se găsesc împreună în același pisc de eluție. Pentru eliminarea acestor impurități se pornește de la preparate globale de γ - globulină, obținute fie prin electroforeza preparativă, fie printr-un procedeu oarecare de precipitare. În aceste cazuri se separă prin filtrare numai două componente, care sînt însă alcătuite în cea mai mare parte din γ - globulinele γM (19S) și γG (7S) (fig. 59) (40).

Tehnica. Operațiile privind umplerea coloanelor și punerea lor în funcțiune au fost descrise anterior (v. p. 55).

Eluția se realizează cu tampon TRIS-HCl 0,1 M și pH 8,0, la care se adaugă clorură de sodiu. Concentrația acesteia poate varia între 0,1 și 1,0 M (110) (44). Obișnuit, se folosesc concentrații de 0,2 M (44) (80). Se poate folosi și tamponul borat pH 8,0 cu un adaos de 0,1 M clorură de sodiu [1] (42) sau tamponul fosfat de potasiu 0,05 M, pH 7,3 cu 1,0 M de clorură de sodiu (101). Ultimul tampon permite eluarea anticorpilor 19S într-un pisc mai delimitat.

În coloane cu dimensiuni de 50—100/4 cm umplute cu Sephadex G-200 se pot introduce pentru fracționare între 5 și 10 ml de ser sanguin dializat în prealabil față de tamponul de eluție. Viteza de curgere a tamponului se poate stabili la orice valoare cuprinsă între 10 și 70 ml. Probele colectate nu trebuie să aibă un volum mai mare de 5 ml. În aceste probe se determină spectrofotometric concentrația proteică și apoi se concentrează printr-un procedeu adecvat (vezi p. 91) pînă la volumul dorit. Înainte de folosire, probele se dializează față de o soluție salină fiziologică (44).

[1] Acid boric 28 g, hidroxid de sodiu 2 g, clorură de sodiu 2,9 g, apă distilată pînă la 1 000 ml.

Scanned with OKEN Scanner

4. Cromotografia pe schimbători de ioni (182) (183)

Serul sanguin supus cromotografiei pe schimbători de ioni prezintă diagrame al căror aspect variază cu natura chimică a schimbătorului şi condiţiile de eluţie aplicate.

Indiferent de aspectul diagramelor (38) (184), γG - globulinele sînt localizate în primele piscuri cromatografice dacă se foloseşte DEAE-celuloză, un pH în jur de 8,0 şi o putere ionică scăzută. γM - globulinele sînt eluate împreună cu alte proteine serice în ultimele piscuri cromatografice (170) (184). Imunoglobulinele γA se eluează între celelalte două γ — globuline, de care nu se poate separa satisfăcător. Ele prezintă o eterogenitate marcată (200).

Deoarece printr-o singură cromatografiere a serului γ - globulinele conţin impurităţi şi din alte proteine, eluatul concentrat se recromatografiază pe acelaşi schimbător sau pe unul antagonist (CM - celuloză) (19).

Preparatele de γ - globulină, pure din punct de vedere electroforetic, pot fi subfracţionate prin cromatografie pe DEAE - celuloză (fig. 60) (83) (39) (22), CM-celuloză (152) şi DEAE-Sephadex (174).

Distribuţia anticorpilor în componenţii B şi C separaţi pe DEAE—Sephadex (fig. 35) este diferită. Astfel anticorpii antilizozomici sînt prezenţi exclusiv în componentul C (196). De aceea, cromotografia pe DEAE—Sephadex permite în acest caz separarea anticorpilor de o parte însemnată de γG -globuline inactive imunologic.

Pentru prepararea cromatografică a imunoglobulinelor poate fi folosit serul integral (113) sau γ — globulină brută, obţinută printr-un procedeu de electroforeză preparativă (44), precipitare cu săruri (19) (53), precipitare prin desalifiere (16), filtrare prin gel (44) etc. În ultimul caz, cromatografia permite prelucrarea unei cantităţi mai mari de anticorpi, conferind materialului preparat cea mai înaltă puritate care se poate asigura printr-o metodă nespecifică de izolare a anticorpilor.

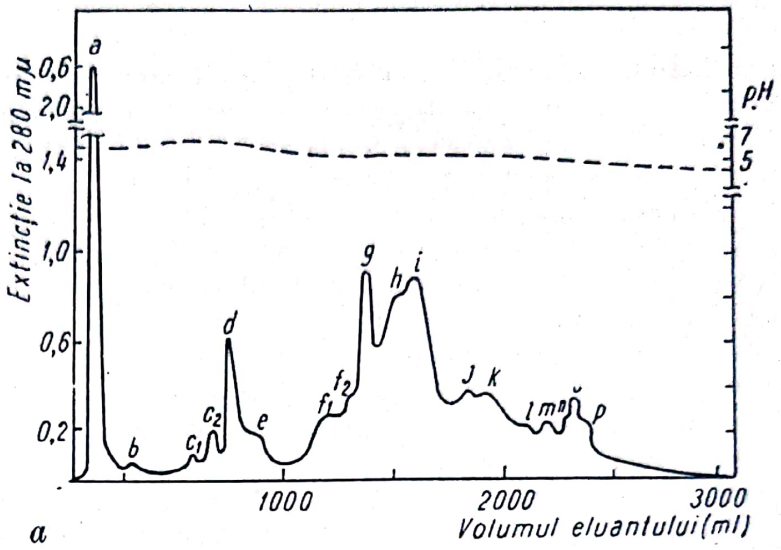
Tehnica de izolare a γG-globulinelor pe DEAE-celuloză şi DEAE-Sephadex (*39*) (*174*). Serul se dializează peste noapte faţă de tamponul fosfat de sodiu şi potasiu 0,02 M, pH 8,0 (39). Se umple o coloană de dimensiunile 30/2 cm cu schimbător şi se echilibrează cu tamponul folosit la dializă. Se introduc în coloană 5 ml de ser dializat şi se începe eluţia cu tamponul de echilibrare. Se colectează fracţiuni de 5 ml şi după aproximativ 150 ml, eluţia se opreşte. Se determină spectrofotometric la 280 mμ extincţia fiecărei fracţiuni şi se trasează curba de eluţie. Se contopesc fracţiunile situate în zona de maximă a curbei, se dializează faţă de apa distilată şi se liofilizează.

Dacă se foloseşte DEAE-Sephadex A-50, după ieşirea primului pisc care conţine γG-globuline (fig. 35, *B*) se poate aplica un gradient din acelaşi tampon pînă la 0,3 M. Primul pisc care părăseşte coloana după aplicarea gradientului este alcătuit din componentul γG-globulinic (fig. 35, *C*). Procentul componenţilor *B* şi *C* depinde de molaritatea tamponului cu care începe eluţia. Pentru tampon-fosfat 0,02 M, componentul *B* reprezintă 38%, iar *C* 62% din γG-globulina totală.

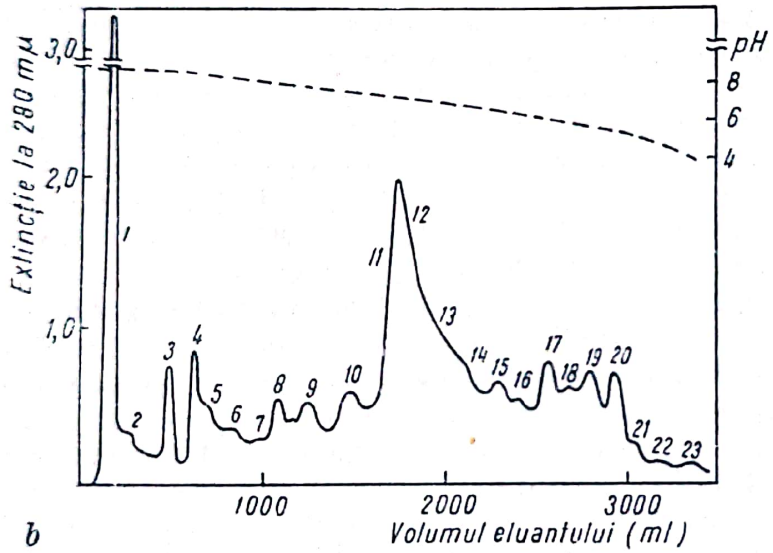
Tehnica de izolare a γM-globulinelor (prin filtrare pe gel şi recromatografie pe DEAE-celuloză (*148*). Soluţia de anticorpi, obţinută printr-o prealabilă izolare a acestora din serul

Scanned with OKEN Scanner

a, Eluția în etape:
I, NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 0,05 M, pH 7,0(*a*);
II, NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 0,02 M, pH 6,0(*a*);
III, NaH_2PO_4 0,05 M (*b*,c_1, c_2,*d*);
IV, NaH_2PO_4 0,05 M, + NaCl 0,02 M (*e*,f_1,f_2);
V, NaH_2PO_4 0,05 M + NaCl 0,05 M (*g,h,i,j,k,l*);
VI, NaH_2PO_4 0,05 M + NaCl 0,1 M (*m,n,o,p*) (după *H. A. Sober și colab., 1956*).



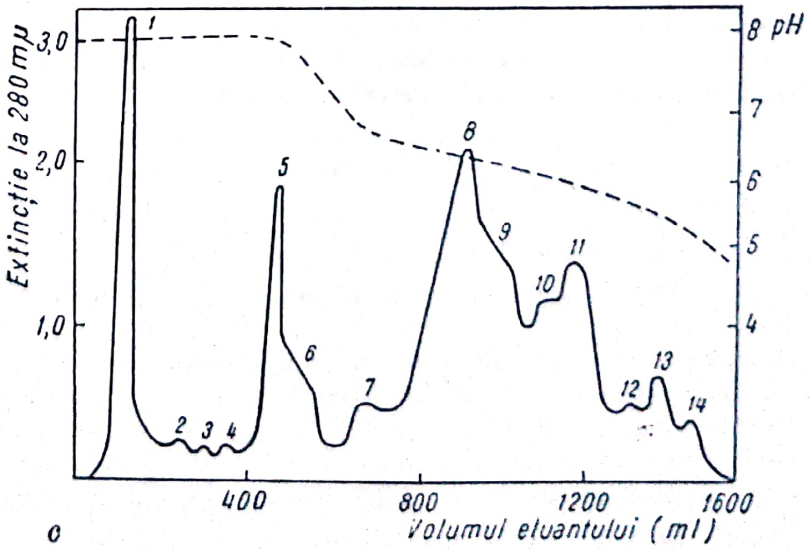
a



b

b, Eluția în gradient cu tampon TRIS-fosfat: *Molaritatea tamponului crește de la 0,005 M la 0,5 M, iar pH-ul scade de la 8,6 la 4,0 (după H. A. Sober și colab., 1958).*

c, Eluția în gradient cu tampon fosfat: *molaritatea tamponului crește de la 0,01 M la 0,3 M, iar pH-ul scade de la 8,0 la 4,5, deoarece se adaugă numai NaH_2PO_4 0,3 M (după J. L. Fahey și colab., 1958).*



c

Fig. 60.—Fracționarea proteinelor serice umane, pe DEAE-celuloză, în funcție de condițiile de eluție aplicate.

Scanned with OKEN Scanner

imun cu ajutorul uneia din metodele curente (precipitare, cromatografiere, fixare și eluție de pe imunosorbenți), se introduce într-o coloană de Sephadex G-200 sau Bio-Gel P—300. Mărimea coloanei se calculează în așa fel încît să se asigure penru fiecare ml din soluția de anticorpi un volum de coloană de 50—100 ml.

Eluția se face cu NaCl 0,5 M în tampon-fosfat-TRIS, pH 8,0. (Tamponul fosfat-TRIS se prepară adăugînd acid fosforic la o soluție 0,02 M de TRIS pînă la pH 8,0, după care se aduce la 1 000 ml cu apă). γM-globulina eluată în primul pisc este impurificată cu γG-globuline. Acestea din urmă se îndepărtează prin filtrare pe DEAE-celuloză. Dacă cantitatea de γG-globuline care impurifică γM-globulina separată depășește 5%, atunci înainte de cromatografie pe schimbătorul celulozic se recomandă o recromatografiere pe gel în aceleași condiții.

Se umple o coloană de DEAE-celuloză de dimensiuni medii după o prealabilă echilibrare a schimbătorului cu tampon-fosfat-TRIS 0,02 M, pH 8,4 (tamponul se prepară prin diluarea unei soluții-stoc de fosfat-TRIS, pH 8,6; aceasta se obține prin adăugarea de acid fosforic la o soluție de 0,3 M TRIS pînă la pH 8,6, apoi se completează cu apă).

Imunoglobulinele γM obținute prin filtrarea pe gel se concentrează și se dializează față de tamponul de echilibrare. Se introduce apoi soluția de anticorpi în coloana de DEAE-celuloză și se eluează cu același tampon. γM-globulinele rămîn adsorbite în timp ce γG-globulinele părăsesc coloana. După ce întreaga cantitate de γG-globuline au părăsit coloana (verificarea se face urmărind scăderea extincției la 280 mμ a fracțiunilor colectate), γM-globulinele se eluează cu tampon-fosfat-TRIS 0,02 M, pH 6,0, conținînd 0,2 M NaCl (tamponul se prepară adăugînd acid fosforic la o soluție de TRIS 0,2 M pînă la pH 6,0, după care se adaugă apă pînă la 1 000 ml. În acest tampon se dizolvă NaCl).

Analizate în ultracentrifugă, imunoglobulinele γM au $S_{20,w}$ = 16—17S și prezintă un înalt grad de puritate.

Tehnica de izolare a γA-globulinelor prin filtrare pe gel și recromatografiere pe DEAE-celuloză (150). Anticorpii purificați prin metodele curente se fracționează pe o coloană de 78/3,7cm de Sephadex G-200, echilibrată în prealabil cu NaCl 0,5 M, tamponată la pH 8,0 cu tampon-fosfat-TRIS (concentrația TRIS 0,02 M). Eluția se face folosind aceeași soluție. Se colectează fracțiuni de 8—10 ml. Se obțin două piscuri distincte. Primul conține componenții 18S și 19S și o mică cantitate de 7S. Acest pisc cuprinde 10% din cantitatea de 270 mg de proteină introdusă inițial în coloană. Cel de-al doilea pisc conține 75% din cantitatea de proteină inițială și este format din componenți 7S și o mică cantitate dintr-un component ușor, cu rapiditate electroforetică mai mare decît γG-globulinele.

Primul pisc se recromatografiază în condiții similare pe Sephadex G-200, după o concentrare care să asigure 17 mg proteină în 2,5 ml tampon. Se colectează fracțiuni de 6,3 ml. Se obține un singur pisc care conține în prima jumătate γM-globuline (31% din proteina inițială), iar în a doua γA-globuline (25% din proteina inițială).

Al doilea pisc din prima filtrare conține γG și γA-globuline. Din acest amestec γA-globulinele se pot obține prin cromatografiere pe DEAE-celuloză. O cantitate de proteină de aproximativ 200 mg poate fi fracționată pe o coloană conținînd 2 g de DEAE-celuloză, folosindu-se un tampon-fosfat-TRIS, pH 8,4, preparat după tehnica descrisă la izolarea γM-globulinelor. Se obțin două piscuri, primul conține γG-globuline (96% din cantitatea de proteină aplicată), iar al doilea pisc se eluează cu tampon-fosfat-TRIS pH 6,0 și conține γA-globuline.

Ambele porțiuni de γA-globuline obținute în condițiile descrise mai sus au aceleași proprietăți fizico-chimice și imunochimice.

Scanned with OKEN Scanner

II. IZOLAREA ANTICORPILOR PRIN METODE IMUNOCHIMICE (SPECIFICE)

Metodele specifice de izolare a anticorpilor se bazează pe proprietatea fundamentală a acestora de a se combina specific cu antigenul care le-a determinat apariţia. Adăugarea antigenului la antiserul corespunzător determină formarea unui complex imun insolubil, la care participă numai anticorpii specifici. În soluţie rămîn anticorpii cu alte specificităţi, γ -globulinele lipsite de activitate imunologică, precum şi celelalte fracţiuni proteice care există în antiser. Complexul insolubil izolat se disociază, iar anticorpii eliberaţi se separă de antigen.

Reacţia antigenului cu anticorpul este însoţită de o scădere a energiei libere, de aceea, disocierea integrală a complexelor imune se realizează numai prin aplicarea unor condiţii drastice care pot altera activitatea imunologică a anticorpilor. Aplicarea procedeelor mai blînde de disociere protejează anticorpii, dar în schimb nu permite disocierea completă, ceea ce scade randamentul preparării lor. Separarea anticorpilor de antigen, după disocierea complexului, este în general destul de dificilă, mai ales în cazul cînd proprietăţile fizico-chimice ale celor două componente sînt asemănătoare. De aceea, astfel de preparate, foarte pure în raport cu anticorpii de alte specificităţi sau γ -globulinele neimune, pot avea impurităţi de antigen, care stînjenesc utilizarea lor în analiza imunochimică. Această dificultate poate fi însă prevenită, adăugînd antiserului antigene *insolubile* sau *insolubilizate* prin fixarea lor de un suport insolubil [1]. În acest fel, disocierea complexului imun produce numai solubilizarea anticorpilor. Astfel se obţin preparate de anticorpi fără impurităţi de antigen.

Obţinerea unor antiseruri care să conţină numai anticorpi cu o singură specificitate (seruri imune monospecifice) se poate realiza prin absorbţia antiserurilor polispecifice. Anticorpii nedoriţi se elimină din antiser, adăugînd acestuia antigenele corespunzătoare şi îndepărtînd complexele insolubile, formate prin centrifugare. În supernatant rămîn doar anticorpii faţă de antigenul care nu s-a adăugat antiserului. Desigur, alături de aceşti anticorpi se găsesc şi celelalte fracţiuni proteice ale serului, inclusiv γ -globulinele, însă prezenţa lor nu împiedică de obicei analizele imunochimice curente. Absorbţia antiserurilor se practică curent în analiza imunochimică. Ea se efectuează mai rapid şi prin operaţii mai simple decît izolarea anticorpilor. În plus, prin absorbţie nu se produce o scădere a concentraţiei anticorpilor care interesează pe experimentator, deoarece asupra lor nu se efectuează operaţii de izolare.

Raportul dintre operaţiile de izolare a anticorpilor şi cele de absorbţie a antiserurilor este ilustrat în figura 61.

---

[1] Substanţele pe care se fixează antigenele insolubilizîndu-se se numesc imunosorbenţi.

Scanned with OKEN Scanner

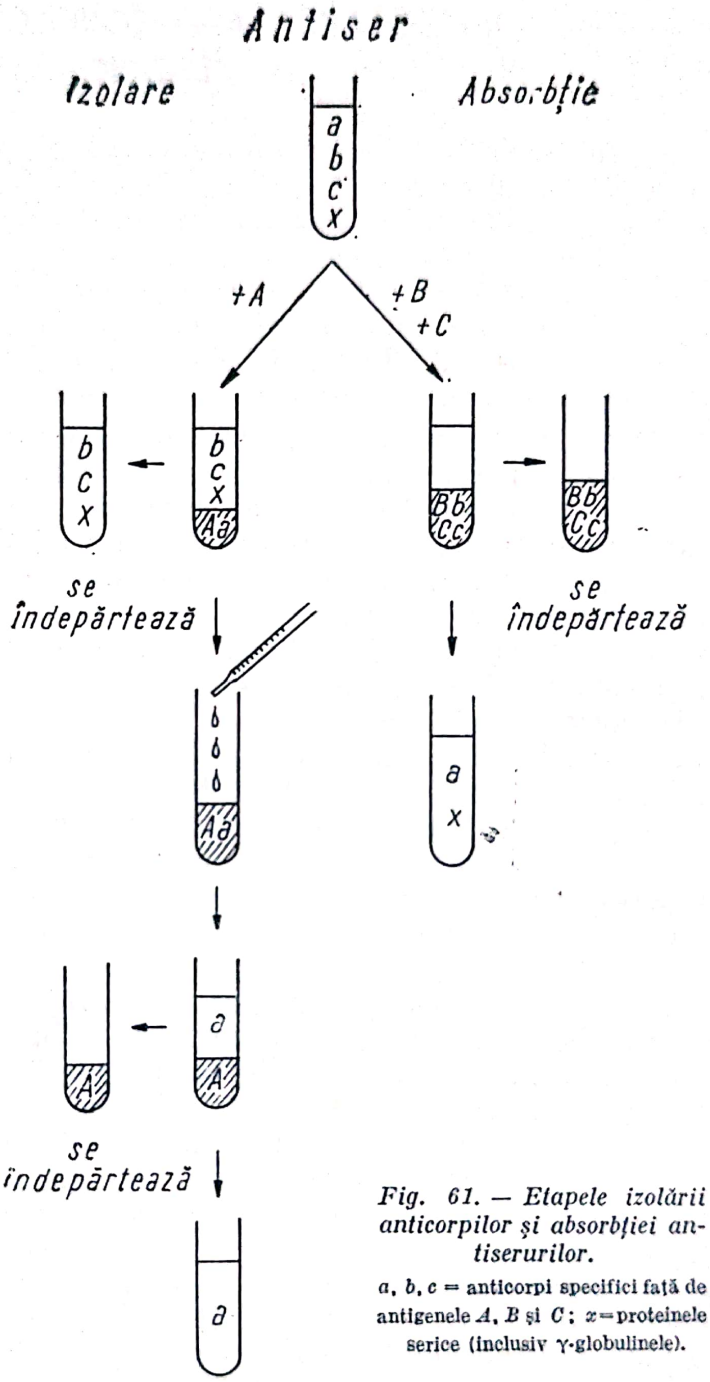


Fig. 61. — Etapele izolării anticorpilor și absorbției antiserurilor.

a, b, c = anticorpi specifici față de antigenele *A, B* și *C*; *x* = proteinele serice (inclusiv γ-globulinele).

1. Etapele izolării anticorpilor

Metodele specifice de preparare a anticorpilor au, cu mici variații, aceleași etape în mersul experiențelor, și anume : a) formarea precipitatului antigen — anticorp prin adăugarea antigenului la serul hiperimun și se-

pararea complexului imun de celelalte proteine serice; b) disocierea complexului antigen — anticorp; c) separarea anticorpilor de antigen, după disocierea complexului specific.

Formarea şi separarea complexului antigen—anticorp

Formarea complexului imun are loc după adăugarea antigenului specific la serul hiperimun care conţine anticorpii corespunzători, precipitabili. Adăugarea antigenului se face pînă cînd cantitatea de precipitat imun este maximă, adică pînă cînd întreaga cantitate de anticorp a reacţionat specific cu antigenul (cantitatea de antigen care trebuie adăugată la un antiser pentru precipitarea întregii cantităţi de anticorpi specifici se stabileşte prin experienţe preliminare).

Se procedează astfel: la un volum dat de antiser, distribuit în cîteva eprubete, se adaugă sub agitare, un volum fix de soluţie care conţine cantităţi crescînde de antigen. Se dozează cantitatea de precipitat imun şi se raportează la cantităţile de antigen adăugate. Se trasează astfel curba de precipitare caracteristică sistemului imun. Cantitatea de precipitat poate fi apreciată comod şi rapid prin măsurarea turbidităţii probelor cu un fotometru sau nefelometru. Curba de precipitare se alcătuieşte raportînd extincţiile turbidităţilor citite la cantităţile de antigen adăugate (fig. 62). (S-au utilizat soluţii de albumină serică bovină şi antiserul de iepure specific (1 ml antiser + 1 ml soluţie de antigen + 1 ml soluţie salină fiziologică). Imunoprecipitarea s-a efectuat la 37°C timp de 30 min. Turbiditatea probelor s-a măsurat la fotometrul Pulfrich, la 600 m μ).

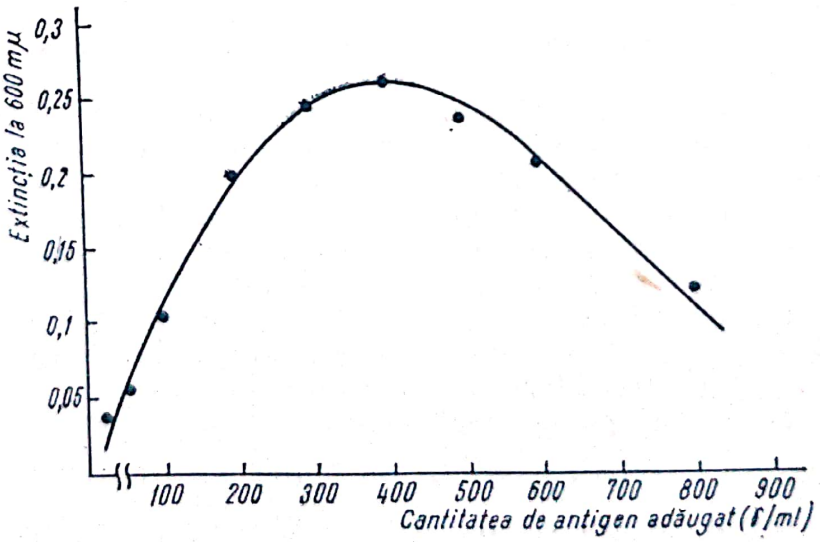


Fig. 62. — Variaţia turbidităţii în funcţie de cantitatea de antigen adăugată antiserului.

Scanned with OKEN Scanner

Din curba de precipitare obţinută, se calculează cantitatea de antigen care trebuie adăugată la un volum determinat de antiser pentru precipitarea întregii cantităţi de anticorpi. În cazul descris în figura 62 trebuie adăugate 400μg albumină bovină pentru precipitarea întregii cantităţi de anticorpi prezenţi în 1 ml de antiser omolog de iepure.

Cantitatea maximă de precipitat imun se formează în zona de echivalenţă. În această zonă, precipitatul format cuprinde totalitatea sau aproape totalitatea anticorpilor existenţi în antiser. Zona este cu atît mai îngustă cu cît antigenul şi anticorpii sînt mai puri, şi cu atît mai largă, cu cît se prelungeşte durata hiperimunizării animalului (76), (165) (166) (vezi şi cap. VII/IV).

Viteza de formare a precipitatului imun depinde de temperatura mediului. De obicei, la temperatura de 37°C, formarea complexului imun se încheie în 30 min. Precipitarea se desăvîrşeşte păstrînd încă 16-24 de ore la 4°C. Precipitatul format se centrifughează la rece (4°C), iar supernatantul care conţine restul proteinelor serice se înlătură. Se spală şi se centrifughează precipitatul de mai multe ori cu soluţie salină fiziologică, pînă cînd în apele de spălare nu mai pot fi identificate urme de proteină. În felul acesta se obţine un precipitat antigen — anticorp în stare destul de pură. Impurităţile de proteine nespecifice nu depăşesc 2-4% (60).

Proteinele complementului pot fi legate şi ele de complexul antigen — anticorp şi astfel pot impurifica preparatele. Îndepărtarea complementului (decomplementarea) se realizează adăugînd antiserului un sistem imun eterolog, format dintr-un antigen oarecare şi anticorpul său specific. Precipitatul format antrenează şi complementul din antiser; el se îndepărtează prin centrifugare. În antiserul decomplementat se practică apoi reacţia imună omologă. Complementul poate fi inactivat mai simplu, adăugînd antiserului EDTA pînă la o concentraţie de 0,005 M (v. p. 289).

Disocierea complexului antigen — anticorp

După separarea şi spălarea complexului imun specific, urmează etapa disocierii acestui complex, prin care se realizează desfacerea anticorpului din legătura sa cu antigenul.

Reacţiile antigen — anticorp sînt reversibile. Asocierea anticorpilor cu antigenele corespunzătoare este o reacţie exotermă, care produce o importantă scădere a energiei libere. De aceea, disocierea integrală a complexelor imune necesită condiţii prea dure, care alterează funcţia anticorpilor. Condiţiile de disociere mai „blînde", care nu afectează activitatea anticorpilor, pun însă în libertate numai o parte din cantitatea totală a anticorpilor cuprinşi în precipitatul imun:

$$Ag_mAc_n \rightleftarrows Ag_mAc_{n-x} + x\,Ac$$

Cantitatea de anticorpi eliberată din complex depinde de mijloacele de disociere aplicate şi de forţa cu care sînt legaţi anticorpii de antigen. Afinitatea anticorpilor faţă de antigenul corespunzător, deci şi forţa de

legare dintre aceste două componente, creşte pe măsură ce avansează hiperimunizarea animalelor. De aceea, în funcţie de felul în care s-a făcut imunizarea animalelor se va realiza disocierea unei cantităţi însemnate de anticorpi sau numai eliberarea unor cantităţi mici (198).

Anticorpii antiproteici disociaţi conţin, aproape întotdeauna, încă o foarte mică cantitate din antigenul corespunzător. Impurităţile de antigen care rămîn în combinaţie cu anticorpii presupuşi puri se pot detecta prin marcarea antigenelor cu substanţe fluorescente, înainte de formarea complexului imun (6). Îndepărtarea completă a antigenului necesită condiţii de temperatură, care determină modificări de conformaţie ale acestuia şi poate chiar ale anticorpului specific. De aceea, aceste impurităţi sînt inevitabile atunci cînd se lucrează cu antigene solubile. Această dificultate poate fi evitată insolubilizînd antigenele înainte de formarea complexului imun (fixare pe imunosorbenţi).

Ruperea legăturilor dintre antigene şi anticorpi se realizează de cele mai multe ori prin mijloace nespecifice, care folosesc variaţia temperaturii, a forţei ionice sau a pH-ului mediului. În cazuri speciale se pot aplica mijloace specifice de deplasare a antigenului din complex cu ajutorul haptenelor.

Disocierea termică. Reacţia dintre antigen şi anticorp se desfăşoară cu degajare de căldură, de aceea se poate presupune că, în caz de ridicare a temperaturii, reacţia va evolua invers. Într-adevăr, dacă complexul antigen — anticorp s-a format la 0°C, la ridicarea temperaturii între 40° şi 60°C o parte din anticorpi se desfac de antigenul corespunzător şi trec în soluţie. Prin creşterea temperaturii s-au disociat din complexele imune o serie de anticorpi. Astfel, izoaglutininele s-au obţinut din complexul lor cu eritrocitele sau cu stroma eritrocitară, prin încălzire la 56°C în soluţie salină fiziologică (85). Hemaglutininele reci au fost de asemenea disociate şi obţinute în stare pură prin încălzirea complexului lor cu stroma eritrocitară şi sînge din grupa 0, la 37°C (54). Anticorpii antitisulari au fost desfăcuţi din combinaţiile lor cu ţesuturile omologe şi eterologe prin încălzire la 60°C (108). De asemenea, prin încălzirea la 56°C a complexului imun s-au obţinut anticorpii specifici şi faţă de *B. thyphosus* şi *B. parathyphosus* (91).

Metoda disocierii complexului specific cu ajutorul căldurii a fost aplicată şi sub forma unui procedeu cromatografic la izolarea aglutininelor A (51). Se umple o coloană cromatografică cu eritrocite A, formolate. După introducerea în coloană a unui ser anti-A, eluţia anticorpilor se face cu o soluţie salină fiziologică, încălzită între 7 şi 68°C. În acest scop, coloana este îmbrăcată cu un manşon de sticlă prin care circulă apă încălzită. Ridicarea temperaturii la nivelul dorit se realizează cu un sistem de încălzire şi de reglare special construit. Eluatele obţinute între 38 şi 63°C au avut cea mai mare putere aglutinantă. Randamentul anticorpilor eluaţi prin acest procedeu este de 50—85%.

Aplicarea disocierii termice pentru obţinerea anticorpilor depinde de rezistenţa lor la temperaturi relativ înalte. În general, tratamentul termic produce alterarea activităţii anticorpilor. De aceea, din totalul

Scanned with OKEN Scanner

de anticorpi disociaţi prin încălzire, numai un anumit procent este capabil să reacţioneze cu antigenul corespunzător. Aceste fapte, asociate la randamentul în general mic cu care se obţin anticorpii prin disociaţie termică, fac ca această metodă să nu se aplice în mod curent la prepararea anticorpilor.

Disocierea prin creşterea puterii ionice. În general, creşterea puterii la scăderea afinităţii dintre antigene şi anticorpii specifici. Astfel, o parte din anticorpii antipneumococici poate fi desfăcută de pe antigenul polizaharidic introducînd precipitatul imun timp de o oră într-o soluţie de clorură de sodiu 15% la 37°C (75). Anticorpii izolaţi precipită cu antigenul omolog în proporţie de 60—100%.

Se procedează astfel (93) : la 100 ml de ser imun se adaugă o cantitate de antigen polizaharidic omolog astfel calculată ca să se obţină punctul de echivalenţă sau să existe un mic exces de anticorpi. După precipitarea completă la 0°C, se centrifughează la rece şi se îndepărtează supernatantul. Se spală precipitatul cu o soluţie salină fiziologică rece, de 6—7 ori, pînă cînd în lichidul de spălare cantitatea de proteină precipitabilă cu acid sulfosalicilic este minimă. Precipitatul spălat se extrage la 37°C cu 30 ml de clorură de sodiu 15%, timp de o oră, în prezenţa unei picături de toluen. După centrifugare, se repetă încă o dată extracţia. Se adună extractele şi se efectuează o dializă de concentrare la rece faţă de soluţia salină fiziologică, în prezenţă de toluen.

În mod asemănător se pot izola şi anticorpii Wasserman din serurile bolnavilor de sifilis (23). Precipitatul obţinut după adăugarea antigenului lipoidic la ser se suspendă în clorură de sodiu 15% şi se agită cu eter. După îndepărtarea eterului şi după centrifugare, supernatantul conţine 30—87% substanţe proteice, capabile să reacţioneze cu antigenul.

Metoda de disociere a complexelor imune folosind soluţii cu putere ionică mare se poate aplica, cu randamente variabile, mai ales la antigenele polizaharidice. Aplicarea acestui procedeu la antigenele proteice nu a permis izolarea anticorpilor corespunzători decît cu un randament neînsemnat (147).

Disocierea prin variaţia pH-ului. Caracterul electrostatic al legăturii antigen — anticorp (179) (56) (171) dă posibilitatea ca disocierea complexului imun să se realizeze şi prin schimbarea pH-ului. Această metodă de disociere este cea mai larg aplicată în practica izolării anticorpilor puri. Complexele imune sînt stabile între limite mari de pH, cuprinse între 4,5 şi 11,0. Astfel, complexul dintre ovalbumină şi anticorpul de iepure corespunzător este stabil în intervalul de pH 6,2 şi 8,45 (105), complexul în care participă albumina serică de bou este stabil între pH 4,5 şi 7,5 (177), iar complexul cu albumină serică de om între pH 5 şi 9 (188).

În afara limitelor de stabilitate, pe măsura acidifierii sau alcalinizării mediului, creşte treptat disocierea complexului antigen — anticorp datorită ruperii succesive a legăturilor electrice dintre cei doi componenţi. Disocierea este completă la pH-uri extreme 2,4 şi 12,3 (105) (177) (178). Disocierea complexelor la aceste valori de pH are avantajul că de cele mai multe ori insolubilizează antigenele proteice, simplificînd operaţia de

separare a anticorpului de antigenul corespunzător (172). Disocierea are loc atît la complexele anticorpilor cu antigenele proteice, cît şi cu cele polizaharidice.

Disocierea complexelor imune la extremitatea alcalină a pH-ului a fost folosită cu succes variabil de unii cercetători. S-a utilizat în acest scop hidroxidul de sodiu (0,04 N — 0,2 N) (15) hidroxidul de bariu (soluţie suprasaturată) (92) sau hidroxidul de calciu (soluţie saturată, pH 12,5) (189). În majoritatea cazurilor disocierea în zona alcalină nu este avantajoasă, deoarece ea reclamă valori foarte mari de pH, care pot altera activitatea imunologică a anticorpilor. Astfel, s-a arătat că precipitatul imun ovalbumină — anticorpi specifici de iepure se dizolvă la pH 11,0 însă nu se disociază (la electroforeză se obţine un singur spot). La pH 11,7 se disociază 17% din anticorpi, iar la pH 12,3 disocierea este totală (105). Un pH atît de alcalin are însă o acţiune dăunătoare asupra anticorpilor. S-a arătat astfel că introducerea anticorpilor într-un mediu cu pH 12,4 provoacă în numai 10 min descompunerea totală a moleculei lor (92). Chiar şi la pH-uri mai mici (92), sau folosind agenţi mai blînzi (hidroxidul de bariu) (74), se poate produce inactivarea parţială sau totală a preparatelor de anticorpi.

Din datele prezentate mai sus rezultă că disocierea complexelor imune prin alcalinizarea puternică a mediului trebuie aplicată numai dacă activitatea imunologică a anticorpilor studiaţi nu este afectată de acest tratament.

Utilizarea acizilor este mai avantajoasă, deoarece ei provoacă disocierea complexelor imune fără a altera într-o măsură semnificativă activitatea anticorpilor (92).

Ramon (162) a folosit pentru întîia oară domeniul acid de pH pentru disocierea antitoxinei difterice din complexul specific, obţinînd o eliberare a anticorpilor în proporţie de 75%. Anticorpii antipneumococici sînt disociaţi din complexul lor cu antigenul specific la pH 3, în proporţie de 75%, iar la pH 2,3 sînt disociaţi 86% din anticorpii precipitabili (111). Disocierea totală a complexului albumină serică de bou cu anticorpul corespunzător reuşeşte la pH 2,4 (177), în timp ce disocierea anticorpilor specifici faţă de albumina serică de om are loc la pH 2,7 (188).

Tratarea anticorpilor cu un acid oarecare la valori scăzute de pH nu influenţează decît în mică măsură capacitatea lor de combinare cu antigenul. Astfel, capacitatea de precipitare a anticorpilor antialbumină serică de bou a scăzut numai cu 3%, deşi acţiunea acidului s-a exercitat 24 de ore la pH 2,0 (176). Date asemănătoare s-au obţinut şi prin tratarea complexului virusul mozaicului tutunului — anticorpul corespunzător, la pH 2,5, timp de 2 ore. Tratamentul n-a influenţat nici activitatea biologică a virusului şi nici capacitatea anticorpilor de a inactiva virusul (176).

Desfacerea complexului specific poate fi făcută, în unele cazuri, şi la valori mai mici de pH. Astfel, s-a realizat disocierea unor precipitate imune care conţin un antigen cu greutate moleculară mică (lizozim sau un polipeptid sintetic), folosind pH-uri foarte acide — 1,8. Se pun în libertate 90—95% din anticorpii conţinuţi în precipitat; ei nu prezintă

Scanned with OKEN Scanner

semne manifeste că ar fi suferit alterări de activitate în urma tratamentului aplicat (50). Disocierea complexului specific la valori mici de pH a fost aplicată cu succes în numeroase cazuri şi pentru complexe imune conţinînd antigene cu greutate moleculară mare (72) (11).

Disocierea complexelor imune poate fi realizată şi la pH-uri mai apropiate de neutralitate, folosind o soluţie apoasă saturată în bioxid de carbon (0,037 M, pH 5,0) (6) (197). Precipitatul imun se amestecă cu soluţia apoasă saturată în bioxid de carbon şi se transferă apoi într-o instalaţie care asigură saturarea soluţiei cu bioxid de carbon timp de 1—2 ore, cît durează disocierea (6). Acest procedeu permite izolarea anticorpilor într-o stare foarte apropiată de cea nativă ; peste 90% din anticorpi îşi păstrează intactă capacitatea de combinare cu antigenul dat. Randamentul care se obţine este însă mic (15—25% pentru anticorpi antiovalbuminici şi 47—63%—anticorpi antihemoglobinici). Complexele imune care conţin polizaharide nu au putut fi disociate prin acest procedeu.

La disocierea precipitatelor imune în mediu acid trebuie să se ţină seama de următoarele indicaţii practice :

— Soluţia cu care se efectuează disocierea este un amestec de acid clorhidric şi clorură de sodiu. Concentraţia clorurii de sodiu este fixă (0,145 M), iar a acidului clorhidric variază în raport cu pH-ul dorit. Pentru pH-ul 1,8 se foloseşte amestecul acid clorhidric 0,02 M — clorură de sodiu 0,145 M (50). Acidul clorhidric poate fi înlocuit cu o soluţie tampon adusă la pH-ul disocierii complexului studiat. Se foloseşte mai ales tamponul citrat-fosfat 0,1 M.

Prezenţa clorurii de sodiu nu este necesară la disocierea cu soluţii apoase de bioxid de carbon. Dimpotrivă, este obligatorie întrebuinţarea soluţiilor cu o cît mai slabă putere ionică.

— Volumul de soluţie, care se adaugă precipitatului imun, trebuie astfel ales ca, după dizolvarea precipitatului, să se atingă o concentraţie proteică cuprinsă între 1 şi 2%.

— Disocierea se poate efectua atît la rece, cît şi la temperatura camerei. Temperaturile mai ridicate favorizează totuşi acţiunea denaturantă a pH-urilor scăzute. Durata disocierii variază în funcţie de afinitatea dintre componenţii sistemului imun folosit şi natura agentului de disociere folosit. De obicei, disocierea nu durează mai mult de 4—5 ore.

— Disocierea trebuie efectuată pe precipitate imune, proaspăt preparate. Dacă operaţiile se fac în zilele care urmează precipitării specifice, disocierea acidă necesită un timp mai îndelungat şi randamentul scade (11). În mediu apos de bioxid de carbon nu s-au observat însă deosebiri în comportarea preparatelor imune proaspete şi a celor vechi de 1—2 zile.

Disocierea cu ajutorul haptenelor. Anticorpii contra substanţelor micromoleculare (haptene) pot fi desfăcuţi de substanţele proteice conjugate, introducînd complexul specific într-o soluţie de haptenă. Astfel, complexul anticorpilor de iepure cu ovalbumina combinată cu acidul p-aminobenzoic diazotat poate fi disociat, folosind o soluţie de p-nitrobenzoat 0,1 M la pH 8,0 (138).

Scanned with OKEN Scanner

Anticorpi față de conjugate galactozil-proteină au fost obținuți prin următorul procedeu (5) : se prepară seruri imune prin inocularea iepurilor cu un antigen complex (p-aminofenil-β-D-galactozid, cuplat cu albumină serică de bou). Peste serul imun se adaugă haptena cuplată cu albumina serica umană. Precipitatul rezultat se spală de cîteva ori cu tampon fosfat, pH 6,8, putere ionică 0,05, pentru îndepărtarea proteinelor nespecifice adsorbite de precipitat. Complexul se disociază adăugînd haptena (p-nitrofenil-β-D-galactozid) în concentrație de 0,05 M și menținînd amestecul la 37°C timp de 30 min; precipitatul se dizolvă complet. Urmează apoi separarea anticorpilor de albumină serică umană prin precipitarea acesteia cu acid clorhidric 0,1 N la punctul izoelectric 4,7. Haptena se îndepărtează din supernatantul care conține anticorpi prin filtrare pe gel de Sephadex G-25. Prin acest procedeu se obțin anticorpi cu un randament de 50—55% și cu o puritate de 80%.

În variante asemănătoare, procedeul a fost folosit la disocierea anticorpilor antihaptenici cu diferite specificități (202) (95) (97).

Disocierea complexelor specifice cu ajutorul soluțiilor de haptenă este foarte comodă, deoarece întregul proces de separare a anticorpilor poate fi efectuat la valori de pH apropiate de cele neutre.

Separarea anticorpilor de antigene

După disocierea complexului imun prin unul din procedeele descrise mai înainte, se efectuează separarea anticorpilor de antigenul corespunzător.

Separarea anticorpilor de antigen este simplă dacă antigenul este insolubil. Astfel, este suficientă numai o centrifugare pentru a separa anticorpii de antigenele celulare după disocierea complexului specific. Datorită avantajelor pe care le oferă utilizarea antigenelor insolubile la separarea anticorpilor au fost elaborate metode de insolubilizare a antigenelor prin fixarea lor pe suporturi insolubile.

Dacă antigenul este solubil, separarea anticorpilor de acesta este aproape întodeauna o operație dificilă. În multe cazuri, deși disocierea complexului specific are loc cu un randament bun, datorită dificultății de separare a anticorpilor de antigenele solubile corespunzătoare, cantitatea de anticorpi este scăzută.

Separarea satisfăcătoare a anticorpilor de antigenele solubile se realizează numai dacă aceste două substanțe proteice au proprietăți fizico-chimice și chimice net deosebite. De aceea, metodele de separare sînt mai mult sau mai puțin particulare complexului imun luat în studiu. Înainte de a alege și de a aplica metoda de separare se impune, ca o condiție prealabilă, cunoașterea naturii fizico-chimice și chimice a antigenului și, dacă este posibil, chiar și a anticorpilor omologi, interesați în reacția imună.

Dacă antigenul se deosebește mult de anticorp prin greutatea moleculară, separarea se poate efectua cu ajutorul ultracentrifugării. Astfel, s-au separat anticorpii antigripali puri de virusul gripal (88) și ovalbumina de anticorpii de iepure specifici (6). Izolarea anticorpilor de antigenele

Scanned with OKEN Scanner

solubile, înzestrate cu o greutate moleculară net diferită, poate fi realizată şi prin filtrare prin gel de Sephadex. Tipul de Sephadex se alege în raport cu greutatea moleculară a celor doi componenţi imuni şi cu diferenţa dintre greutatea lor moleculară. Pentru separarea anticorpilor specifici de iepure (G. M. = 160 000), de lizozim (G. M. = 14 000) sau de un polipeptid sintetic (G. M. = 10 200), după disocierea complexului imun s-a folosit cu succes tipul de Sephadex G-75 (50). Aceasta întîrzie filtrarea substanţelor cu greutate moleculară mai mică de 20 000, lăsînd însă nemodificată trecerea substanţelor cu greutate moleculară mai mare. Echilibrarea şi eluţia coloanei umplute cu Sephadex se efectuează întodeauna cu soluţia acidă care a servit pentru disocierea complexului imun. Folosirea unei soluţii cu un pH mai aproape de neutralitate poate provoca recombinarea anticorpilor cu antigenul, ceea ce micşorează sau chiar anulează randamentul obţinerii anticorpilor.

Dacă antigenul se deosebeşte de anticorp prin semnul sau mărimea încărcării electrice, separarea lor poate fi realizată prin electroforeză sau cromatografie pe schimbători de ioni. Aplicarea electroforezei este însă limitată de faptul că analiza trebuie efectuată la un pH acid, care nu permite de obicei experienţe reuşite (de ex. agarul nu se gelifică la pH-uri foarte acide). Această limitare intervine şi la aplicarea cromatografiei. Majoritatea schimbătorilor pe bază de celuloză şi dextran nu pot fi folosiţi la pH-uri prea acide. Doar SE-celuloza sau SE-Sephadexul ar putea fi utilizaţi în acest scop, deoarece lucrează şi la pH-uri sub 4.

Separarea anticorpilor este facilitată dacă antigenul corespunzător este insolubil sau puţin solubil în mediul acid care serveşte la disocierea complexului imun. Astfel, disocierea complexului urează—anticorp cu acid clorhidric 0,1 N provoacă insolubilizarea enzimei în timp ce anticorpii trec în soluţie (192). De asemenea, azoproteinele[1], puţin solubile în mediu acid, pot servi atît la separarea anticorpilor contra azoproteinelor (72) (11), cît şi contra proteinelor native corespunzătoare (73). Proteinele tisulare au şi ele o solubilitate mai scăzută la pH-uri acide (210). De aceea, la descompunerea acidă a precipitantului imun ele trec în soluţie în proporţie mult mai mică decît anticorpii. Dacă se aplică în plus şi condiţii de disociere, care determină numai desfacerea unei părţi din anticorpii legaţi, antigenul rămîne în precipitat datorită restului de anticorpi care îl imobilizează. Folosind tampon citrat-fosfat 0,1 M de pH 3,2, trec în soluţie 10—25% din anticorpii aflaţi în precipitat. Antigenul tisular rămîne în proţiunea nedizolvată a precipitatului imun şi se elimină printr-o centrifugare. De sigur că în aceste cazuri se extrag din precipitat numai anticorpii care au o afinitate minimă pentru antigenul corespunzător. Totuşi, între aceşti anticorpi şi cei prezenţi în antiserul iniţial nu s-au evidenţiat deosebiri de specificitate (210).

În sfîrşit, anticorpii pot fi separaţi de antigenul solubil corespunzător prin precipitarea unuia din cei doi componenţi cu un agent specific.

---

[1] Azoproteinele sînt substanţe proteice asociate cu diferite haptene prin legături diazo.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel, după disocierea complexelor imune albumină—anticorpi, ultimii pot fi separaţi prin precipitarea cu sulfat de amoniu 33—50%. La această concentraţie precipită anticorpii, iar albuminele rămîn în soluţie. Aplicat la sitemul ovalbumină-anticorpi de iepure, acest procedeu a dus la obţinerea anticorpilor cu un randament de 70—90% şi cu o puritate de 90% (12).

Precipitarea antigenului din amestecul cu anticorpi poate fi realizată printr-un procedeu general care implică tiolarea antigenelor proteice (180). Antigenul proteic se tratează cu N-acetil d,l-homocistein-tiolactonă, iar antigenul tiolat se întrebuinţează pentru precipitarea anticorpilor. Complexul antigen—anticorp se disociază cu tampon glicină-acid sulfuric pH 2,4 la rece. Antigenul tiolat, eliberat în urma disocierii, este precipitat cu 3,6-bis-(acetoximercurimetil)-dioxan. Această substanţă fixează moleculele de antigen prin legături —S—Hg—, ceea ce determină precipitarea lor instantanee. După centrifugare, cea mai mare parte din anticorpi rămîn în soluţie. S-au obţinut astfel anticorpi de iepure antiovalbumină şi antialbumina serică bovină, cu o puritate de 90%. Într-un grad de puritate mai scăzut, s-au obţinut anticorpi antiribonuclează (79%). Randamentul obţinerii anticorpilor a variat între 22 şi 78%, după modul în care tiolarea a afectat capacitatea de precipitare a antigenului cu anticorpii corespunzători.

2. Utilizarea imunosorbenţilor la izolarea anticorpilor

Datorită faptului că antigenele insolubile pot fi uşor îndepărtate din complexul imun disociat, s-au căutat diferite metode de insolubilizare a lor. Prin aceste metode s-a urmărit fixarea antigenelor pe suporturi insolubile, fără pierderea proprietăţilor imunologice. Materialele, de provenienţă diferită, care au proprietatea de a adsorbi antigenele proteice, poartă denumirea de imunoadsorbenţi sau mai scurt imunosorbenţi.

Printre primele materiale folosite au fost particulele de colodiu (126), caolinul (120) şi cărbunele. Mai recent s-a utilizat celuloza tratată cu chitozan (207), gelul de hidroxid de aluminiu (9), perle de sticlă cu diametrul de 44μ (193) şi gelul de poliacrilamidă (7).

Antigenele asociate la aceste suporturi sînt capabile să fixeze specific anticorpii corespunzători dintr-un antiser dat. Deoarece antigenul este legat de suport prin forţe de adsorbţie nespecifice slabe, în timpul disocierii complexului imun o parte din antigen este şi el desorbit şi impurifică preparatul de anticorpi. În plus, imunosorbenţii care au legat antigenul sînt capabili să adsoarbă din antiser nu numai anticorpii corespunzători, ci şi alte proteine; o parte din aceste proteine poate fi ulterior eluată o dată cu anticorpii disociaţi, impurificînd astfel preparatul. La aceste dezavantaje se mai adaugă şi faptul că acești imunosorbenţi sînt capabili să adiţioneze numai o cantitate mică de antigen. Astfel, pe 1 g perle de sticlă s-au adiţionat numai 0,8 mg antigen (ovalbumină). În gene-

Scanned with OKEN Scanner

ral, imunosorbenţii de felul celor amintiţi mai înainte nu pot fixa decît o cantitate mică de anticorpi[1].

Pentru eliminarea deficienţelor semnalate s-a recurs la cuplarea antigenelor pe imunosorbenţi printr-o legătură chimică stabilă. Pentru fixarea antigenelor proteice de suporturi insolubile se întrebuinţează mai ales legătura diazo. Compusul diazo fixat pe imunosorbent se leagă de majoritatea proteinelor, deoarece el poate reacţiona cu cîţiva aminoacizi diferiţi (130). Sînt interesate în această cuplare grupările : ε - amino a lizinei, imidazolică a histidinei, indolică a triptofanului, guanidinică a argininei, sulfhidrilică a cisteinei şi fenolică a tirozinei (82). Utilizarea legăturii diazo este avantajoasă şi pentru că ataşarea ei de antigenele proteice se realizează în limite de pH şi de temperatură care nu afectează capacitatea lor de reacţie cu anticorpii respectivi (130). În afara legăturii diazo, proteinele pot fi fixate pe suporturi insolubile şi prin intermediul grupărilor izocianat (10) sau a clorurilor de acid (85).

Avantajele pe care le prezintă fixarea chimică a antigenelor sînt : o fixare mai bună a antigenelor de imunosorbent, reducerea adsorbţiei nespecifice şi o capacitate mai mare de fixare a anticorpilor.

Antigenele pot fi fixate prin intermediul unei legături chimice de un număr mare de imunosorbenţi. În prezent, cele mai utilizate sînt suporturile alcătuite din răşini polistirenice şi cele pe bază de celuloză. Într-o măsură mai mică, în probleme speciale, pot fi folosite şi alte suporturi, ca răşini schimbătoare de ioni cu grupările active transformate în cloruri acide (85) (87) (86), eritrocite (35) (41) (49). În ultima vreme s-au preparat imunosorbenţi cu o capacitate de adsorbţie a anticorpilor foarte mare (1 g anticorp/1 g adsorbent), cuplînd antigenele cu polimerii insolubili ai proteinelor (149).

Capacitatea conjugatelor antigen-polistiren de a fixa anticorpii corespunzători este de aproximativ 30 de ori mai mică decît a conjugatelor antigen-celuloză, ceea ce dovedeşte că suporturile hidrofile sînt mai eficiente decît cele hidrofobe. Astfel, cantitatea maximă de anticorpi pe care o poate adsorbi 1 g de conjugat antigen-polistiren variază între 4 şi 12 mg, în timp ce conjugatele antigen-celuloză fixează pînă la 300 mg de anticorpi specifici.

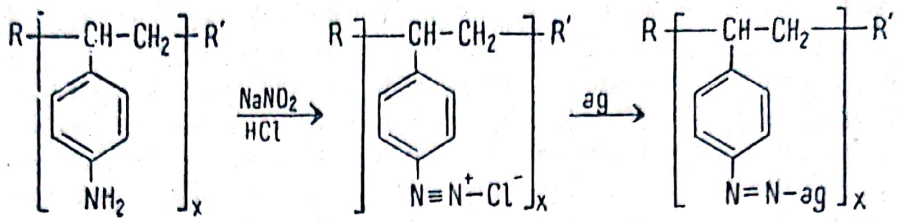
Imunosorbenţi polistirenici (116) (69) (117)

Imunosorbenţii de acest fel se obţin prin nitrificarea polistirenului şi reducerea compusului obţinut la poliaminopolistiren. Acesta din urmă, avînd grupări aminice libere, poate fi diazotat, formînd polidiazopolistirenul, care se cuplează cu uşurinţă cu antigenele proteice.

---

[1] Cantitatea de anticorpi, în mg, care poate fi fixată de 1 g imunosorbent tratat cu antigenul corespunzător reprezintă capacitatea imunosorbentului.

Scanned with OKEN Scanner



Poliaminopolistiren Polidiazopolistiren Conjugat antigen-polistiren

Tot pe bază de polistiren poate fi preparat și acetatul polistiril mercuric, în care legătura dintre imunosorbent și antigen se realizează prin intermediul atomilor de mercur și a grupărilor sulfhidrilice din proteine (98).

Diazotarea poliaminopolistirenului și cuplarea lui cu antigenul (98) (70) (203). Diazotarea poliaminopolistirenului se face la 0°C în prezența unui exces de azotat de sodiu și a trei echivalenți de acid clorhidric. La 8 g poliaminostiren suspendat în 160 ml HCl N, răcit la 0°C, se adaugă încet, sub agitare, 40 ml dintr-o soluție 15% $NaNO_2$ (6 g), de asemenea răcită la 0°C. Amestecul se agită încă 30 min. Sfîrșitul diazotării se urmărește cu o hîrtie indicator iod-amidonată care își schimbă culoarea. Se spală apoi succesiv cu 500 ml soluție CH_3COONa 5%, 500 ml soluție de uree 5% (pentru distrugerea excesului de acid azotos), 1 000 ml apă distilată, 500 ml NaCl 0,15 M și apoi se suspendă în NaCl 0,15 M. Se ajustează pH-ul la 7,5 cu $NaHCO_3$.

La suspensia de polistiren diazotat și răcit la 0°C se adaugă apoi încet, sub agitare, soluția de antigen de asemenea răcită de ex. (2 g albumină serică umană dizolvată în 10 ml soluție salină fiziologică, pH 7,5). Se agită amestecul la 0°C timp de 18—24 de ore. Se spală apoi conjugatul antigen-polistiren cu 500 ml NaCl 0,15 M. Cantitatea de albumină fixată pe rășină se determină prin diferența dintre cantitatea de albumină adăugată și cea prezentă în apa de spălare. În general, 1 g de poliaminostiren fixează 0,1—0,5 g antigen.

Conjugatul antigen-polistiren se obține sub forma unui preparat brun-gălbui sau brun închis. Grupările diazo nereacționate pot fi identificate cu β-naftol; acesta își schimbă culoarea în prezența grupărilor diazo libere. Distrugerea lor poate fi realizată prin resuspendarea conjugatului într-o soluție proaspătă de antigen sau, mai simplu, în NaCl 0,15 M timp de 10—14 zile. Grupările diazo pot fi blocate și prin adiție de glicină și îndepărtarea excesului prin spălare. De asemenea, agitarea rășinii într-o soluție de rezorcină (2%)-acetat de sodiu (5%) timp de 24 de ore inactivează grupările diazo libere. Urmele de rezorcină se îndepărtează prin spălare. Eficiența oricăreia din metodele descrise mai sus se verifică prin absența schimbării culorii soluției de β-naftol.

Fixarea și eluția anticorpilor. În acest scop se pot aplica două tehnici principale: introducerea conjugatului insolubil antigen-polistiren în antiser sau trecerea antiserului printr-o coloană cromatografică, umplută cu acest conjugat.

Scanned with OKEN Scanner

În primul caz se face o suspensie cît mai omogenă de conjugat antigen-polistiren în antiser, după care se centrifughează amestecul. Precipitatul depus este format din conjugat pe care sînt fixaţi anticorpii corespunzători. Se spală de cîteva ori cu o soluţie salină fiziologică rece pentru îndepărtarea proteinelor nespecifice adsorbite. Disocierea complexului imun format se efectuează cu ajutorul unor soluţii tampon 0,1 M cu pH acid (2,5—3,5). Disocierea se efectuează la 4°C sau la temperatura camerei, timp de 90—120 min (111). Anticorpii eluaţi trec în soluţie şi se separă de conjugatul antigen-polistiren printr-o simplă centrifugare.

Tehnica cromatografică este mai utilizată, deoarece simplifică şi automatizează analizele. În plus, cromatografia permite studiul în timp al proceselor de adsorbţie şi de eluţie a anticorpilor prin colectarea în fracţiuni a lichidului care se scurge din coloană.

Coloana cromatografică se umple cu cantitatea dorită de conjugat antigen-polistiren, folosind tehnica arătată la cromatografia pe schimbători de ioni (p. 68). Se spală coloana cu o soluţie salină fiziologică şi se constată că eluatele nu conţin substanţe proteice. Se introduce apoi antiserul pe coloană şi se lasă să pătrundă încet în imunosorbent. După ce întreaga cantitate a pătruns în coloană se spală cu soluţie salină fiziologică, folosind un debit de maximum 25 ml/oră. Spălarea durează pînă cînd în eluate nu mai trec proteine ($E^{1\,cm}_{280\,m\mu} < 0{,}05$). În acest moment, toate proteinele din antiser, care nu au fost legate specific de imunosorbent, au ieşit din coloană. Dacă se adaugă o cantitate prea mare de antiser se poate ca, alături de proteinele nespecifice, să se îndepărteze şi anticorpii specifici aflaţi în exces. În acest caz, eluatele se trec peste o altă coloană umplută de asemenea cu conjugatul antigen-polistiren.

Disocierea şi desorbţia anticorpilor specifici fixaţi în coloană se face trecînd prin aceasta soluţii acide care au de obicei un pH de 3,0. Se pot folosi şi soluţii tampon fosfat—citrat, glicină—acid sulfuric, acetat de sodiu—acid clorhidric, clorură de sodiu—acid clorhidric. Molaritatea tampoanelor poate să oscileze între 0,1 şi 0,5. Se pot face şi eluţii succesive, folosind tampoane cu un pH din ce în ce mai scăzut sau (şi) cu o molaritate din ce în ce mai crescută. În aceste cazuri se obţin diferite fracţiuni de anticorpi care diferă între ele prin afinitatea sau specificitatea faţă de antigenul dat.

În eluate de 2—5 ml se determină concentraţia proteică prin spectrofotometrie la 280 mμ şi se măsoară pH-ul. Se adună la un loc eluatele care conţin anticorpii, se neutralizează cu NaOH, se purifică prin dializă sau filtrare prin gel şi se liofilizează sau se păstrează în soluţii concentrate la 4°C.

Aplicaţii. Numeroase antigene proteice au fost cuplate cu polistirenul prin intermediul legăturii diazo, iar conjugatele rezultate au fost utilizate cu succes la îndepărtarea specifică şi completă a anticorpilor din antiserurile corespunzătoare. Astfel s-au cuplat amilaza, pepsina, ribonucleaza şi carboxipeptidaza (58) (59), albumina serică de bou şi de om, proteinele din serul uman, γ-globulinele (69) (70) (173) şi diferiţi anticorpi (116) (117) (208). Activitatea enzimatică sau imunologică a proteinelor se menţine şi după fixare. Albumina serică de bou este fixată de polimer într-o proporţie de 13 mg/g (58). Această cantitate de albumină ocupă o supra-

față de 3 m² (59). Conjugatele albumină serică umană-polistiren, introduse într-o coloană cromatografică au servit pentru fixarea completă a anticorpilor specifici. Eluția ulterioară a acestora s-a făcut prin creșterea acidității eluantului. S-au obținut trei fracțiuni de anticorpi, avînd capacitatea să reacționeze cu grupări determinante diferite din molecula de albumină (203).

Anticorpii precipitanți pot fi eluați ușor la pH 3,0 din conjugatele antigen-polistiren. S-au obținut preparate cu o puritate de 80%. Randamentul preparării anticorpilor n-a depășit însă 35%.

Conjugatele de alergene-polistiren îndepărtează specific anticorpii blocanți, hemaglutinanți și pe cei care sensibilizează pielea, din serul indivizilor cu alergie la polen (71) (48). Randamentul eluării acestor anticorpi este însă mic (71) (24) (167).

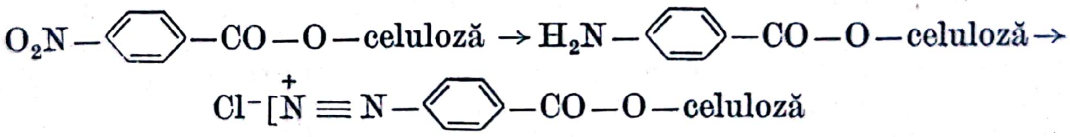
Cu ajutorul unor haptene fixate de poliaminopolistiren prin intermediul purtătorului proteic s-a elaborat o micrometodă rapidă, care permite fracționarea anticorpilor antihaptenă (102) (103) (104). Aplicînd un gradient de haptenă în etape, se pot subfracționa anticorpii cu o singură specificitate în funcție de afinitatea pe care o au pentru haptena respectivă. Cu această metodă se poate evidenția eterogenitatea zonelor de combinare ale anticorpilor antihaptenă (v. cap. V).

Imunosorbenți celulozici (206)

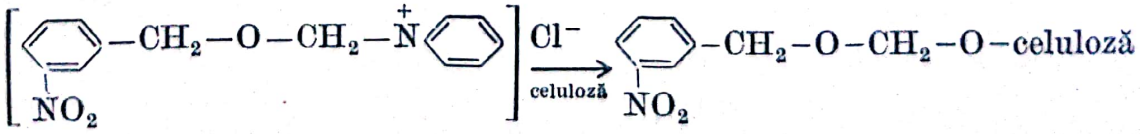
Prepararea imunosorbenților pe bază de celuloză se realizează prin transformarea celulozei într-un derivat cu grupări nitro, reducerea acestora la grupări amino urmată de o reacție de diazotare și de cuplare cu antigenele proteice (61).

Grupările nitro pot fi introduse în molecula celulozei prin intermediul unor nitroderivați capabili să reacționeze cu oxidrilii resturilor de glucoză. Sînt folosiți:

a) Clorura de p-nitrobenzoil (13) (66) (194). Esterul celulozei cu acidul p-nitrobenzoic se reduce și se diazotează succesiv, obținîndu-se o grupare diazo fixată de celuloză:

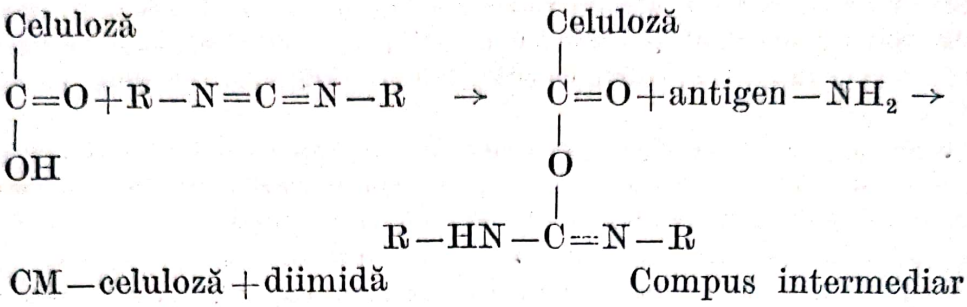


b) Clorura N—(m-nitrobenziloxi)—metilpiridiniu (64) (66). Se formează m-nitrobenziloximetilceluloză, care se reduce și se diazotează succesiv pînă la diazoderivatul corespunzător:

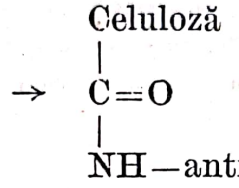


În afară de celuloza cuplată cu acești doi compuși, s-a mai utilizat și celuloza esterificată cu rezorcină și apoi cuplată cu acidul p-aminofenilazo-p-fenilarsonic diazotat (112).

Proteinele şi haptenele cu grupare aminică liberă pot fi fixate direct pe CM-celuloză în prezenţa N,N′ - diciclohexilcarbodiimidei (206) (205). Reacţia are loc astfel :



CM−celuloză + diimidă — Compus intermediar



(R−NH−CO−NH−R)

Antigen cuplat de celuloză

Proteinele pot fi legate chimic de celuloză şi prin intermediul altor grupări. Astfel, bromacetilceluloza este capabilă să fixeze proteinele, legîndu-se de grupările sulfhidrilice şi (sau) aminice ale resturilor de aminoacizi (89). Acest procedeu a fost aplicat pentru fixarea anticorpilor de celuloză, dar el poate fi extins şi la diferite antigene proteice.

Cantitatea de antigene pe care o pot lega p-diazobenzoilceluloza şi m-diazobenziloximeticeluloza depinde de numărul de grupări diazo din molecula lor, precum şi de mărimea suprafeţei totale a particulelor (66).

Cantitatea de antigene fixate creşte o dată cu mărirea numărului de grupări diazo pînă la o anumită valoare. Astfel, un preparat de p-diazobenzoilceluloză care conţine 0,033 g N% fixează 0,7 mg albumină serică de om/g imunosorbent, în timp ce alt preparat care conţine 6 g N % poate fixa 117 mg albumină/g imunosorbent. Creşterea numărului de grupări diazo nu duce însă la mărirea cantităţii de proteine fixate pe celuloză.

Mărimea totală a suprafeţei particulelor de imunosorbenţi influenţează direct cantitatea de antigen fixată, chiar dacă numărul de grupări diazo al imunosorbentului este constant. Creşterea suprafeţei globale a particulelor se realizează prin dizolvarea celulozei aminate în soluţie cuproamoniacală şi reprecipitarea ei sub forma unei suspensii fine. Ulterior această suspensie fină este diazotată şi cuplată cu antigenul proteic.

Între cantitatea de antigen legată chimic de imunosorbent şi cantitatea de anticorp care se fixează prin reacţia imună există, desigur, o concordanţă, deoarece numărul de molecule de anticorp adiţionate la

imunosorbent depinde de cantitatea de grupări active ale antigenlui, aflate pe suprafaţa particulelor imunosorbentului. Mărirea cantităţii de antigene fixate chimic pe seama măririi suprafeţei totale a particulelor de imunosorbent duce la o creştere însemnată a capacităţii acestuia.

Mărirea suprafeţei totale a particulelor de m-diazobenziloximetil-celuloză prin reprecipitarea celulozei aminate din soluţia cuproamoniacală determină o creştere de peste 80 de ori a capacităţii imunosorbentului. În aceste condiţii, cantitatea de anticorpi pe care o poate adiţiona imunosorbentul ajunge la 1/3 din greutatea sa totală.

Din cele arătate mai sus reiese clar că modul de preparare a imunosorbenţilor influenţează nemijlocit capacitatea lor.

Varietatea imunosorbenţilor celulozici aflaţi în comerţ este în general redusă (PAB-Celulose Serva, Celex-PAB Calbiochem etc.), de aceea am considerat util să prezentăm în anexa IV prepararea unuia dintre cei mai utilizaţi.

Diazotarea p-aminobenzoilcelulozei şi cuplarea cu antigenele (13). Se procedează astfel: 5g p-aminobenzoilceluloză se suspendă în 10 ml HCl 2N, se amestecă cu 20ml de apă şi se răceşte în baia de gheaţă. Se adaugă în porţiuni mici, sub agitare continuă o soluţie rece de $NaNO_2$ 0,5 M pînă cînd testul cu hîrtie iod-amidonată se păstrează pozitiv, timp de 15 min. Se continuă amestecarea încă 15 min, apoi se filtrează şi se spală cu apă răcită la 0°C, uşor acidulată.

Precipitatul sării de diazoniu se adaugă la soluţia de antigen. Se prepară în acest caz o soluţie de 2% proteină în tampon borat, pH 8,75. Raportul optim între antigen (greutate uscată) şi diazoderivatul celulozei (exprimat în p-aminobenzoilceluloză) adăugat este de 1 : 4 sau 1 :5. Se agită amestecul 2 ore, la rece, după care se lasă în repaus, la aceeaşi temperatură, încă 24 de ore. Produsul se filtrează şi se spală cu cantităţi mari de tampon, pentru îndepărtarea proteinelor nefixate. Preparatul se conservă în frigider în soluţie tampon, apă distilată sau soluţie salină fiziologică.

Diazotarea m-aminobenziloximetilcelulozei şi cuplarea ei cu antigenele (64) (66). Precipitatul umed de celuloză aminată (aproximativ 3 g greutate uscată) se suspendă în 500 ml HCl 5% răcit la 0°C. Se adaugă apoi, sub agitare, în porţiuni mici, 10 g $NaNO_2$. Diazotarea se continuă la rece, cu amestecare energică, încă 30 min. Suspensia se spală rapid, prin centrifugare de două ori, cu cîte 2 l apă rece şi o dată cu 1 l tampon borat 0,1 M şi pH 8,6. La precipitatul spălat se adaugă tampon borat de aceeaşi molaritate şi pH (pînă la volumul final de 150 ml), în care s-au dizolvat 3 g antigen (albumină serică de om). Suspensia se menţine în frigider peste noapte şi apoi se separă de proteinele nefixate de celuloză prin spălări repetate cu tampon, apă distilată sau soluţie salină fiziologică. Conjugatul antigen-imunosorbent se păstrează în frigider sub formă de suspensie în apă distilată sau în soluţie salină fiziologică.

Grupările diazo nereacţionate cu antigenul pot fi evidenţiate pe o probă alicotă prin reacţia cu β-naftol. Dacă se adiţionează β-naftolul, celuloza capătă o culoare portocalie caracteristică. Distrugerea grupările diazo se realizează prin unul din procedeele descrise la aplicarea imunosorbenţilor polistirenici (p. 243).

Scanned with OKEN Scanner

Cuplarea CM-celulozei cu antigenele (205). Se dizolvă 100 mg proteină în 2 ml apă şi se adaugă sub agitare CM-celuloză, în porţiuni mici pînă cînd soluţia se îngroaşă. În acest moment se adaugă 0,2 g N,N'-diciclohexilcarbodiimidă dizolvată în 0,5 ml de tetrahidrofuran şi 1 ml apă distilată (două faze). După amestecare se adaugă în continuare CM-celuloză pînă la 0,6 g. Se lasă amestecul două zile la temperatura camerei, se adaugă 10 ml de apă, se dispersează suspensia şi se filtrează. Se spală pe filtru cu cantităţi mari de soluţie de carbonat de sodiu diluat, acid clorhidric 0,01 M şi apă.

CM-celuloza folosită trebuie să fie în formă acidă. De aceea înainte de întrebuinţare se spală cu acid clorhidric 4N, apă şi acetonă apoi se usucă la temperatura camerei.

Fixarea şi eluţia anticorpilor. În acest scop se foloseşte mai ales tehnica cromatografică. Se umple o coloană cu conjugatul antigen-imunosorbent şi se spală cu NaCl 0,15 M pînă cînd eluatele numai conţin proteine ($E^{1\,cm}_{280\,m\mu} < 0{,}05$). În acest moment se introduce în coloană antiserul diluat 1 : 1 cu NaCl 0,15 M. Cantitatea de antiser introdusă depinde de capacitatea şi cantitatea imunosorbentului. Într-o coloană umplută cu 1 g m-dizobenziloximetilceluloză (capacitate de aproximativ 300 mg de anticorp/g) se pot introduce 5 ml de antiser diluat cu 5 ml NaCl 0,15 M. Introducerea antiserului prin coloană trebuie să se facă foarte încet, numai sub acţiunea gravităţii. Pătrunderea antiserului trebuie astfel reglată ca ea să dureze cel puţin 2 ore la temperatura camerei pentru ca anticorpii să poată reacţiona cît mai complet cu antigenul corespunzător, legat de celuloză. Se spală apoi coloana cu un volum mic de NaCl 0,15 M. Se îndepărtează astfel proteinele de balast din antiser, precum şi anticorpii care nu au fost reţinuţi de coloană (25—40% din anticorpii totali). Aceştia se reţin trecînd eluatul peste o altă coloană, în condiţiile descrise mai sus.

Spălarea coloanelor după formarea complexului antigen-anticorp continuă pînă cînd în eluate nu se mai identifică proteine. În acest moment se introduce în coloană soluţia acidă care determină disocierea complexului imun şi eluţia anticorpilor. Pot fi utilizate soluţii acide, cu pH-ul cuprins între 2,0 şi 3,5 pe bază de acid clorhidric (62), acid acetic sau tampoane de glicină (125) (2) (204), citrat (194) sau fosfat (205) (201). Eluţia cu aceste tampoane nu scoate complet anticorpii din coloană şi determină o pierdere mai mică sau mai mare a activităţii lor imunologice. În special, tampoanele pe bază de fosfat scad precipitabilitatea anticorpilor eluaţi de pe imunosorbent, scăderea fiind proporţională cu concentraţia fosfatului (205).

Se colectează eluatele în fracţiuni de 2—5 ml, se citesc la 280 mμ, se adună probele care conţin cantităţi semnificative de proteine (anticorpi) şi se neutralizează cu tampon borat pH 8,2. Soluţiile de anticorpi se purifică şi se concentrează apoi prin metodele obişnuite.

Eficacitatea diferitelor procedee de eluţie şi a unor imunosorbenţi celulozici este redată în tabelul nr. 24.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL NR. 24

Caracteristicile imunosorbenților celulozici (adaptat după N. W e l i k y și colab., 1965)

Derivatul de celuloză	PAB*				MABOM			CMC
Antigenul cuplat	GGU	ASB	ASB	ASU	ASU	GGU	OVG	ASB GGU
Cantitatea de antigen legată (mg/g celuloză)	33	15	—	5	125	271	450	100
Cantitatea de anticorp complexat (mg/g)	—	17	—	—	125	103	100	20
Procentul de anticorpi eluați	67	86	46—70	22—33	60	50	10—25	70—100
Procentul de anticorpi precipitanți din eluat	—	89	83	—	90—100	90—100	90—100	86—100
Proteine adsorbite nespecific (mg/ml ser)	0,2—4,0				1	1	1	0,011
Solventul folosit	citrat	HCl	glicină HCl	glicină HCl 0,2M	HCl	HCl	HCl	HCl
	pH = 3,2 0,2M	pH = 3,2	pH = 3,0	pH = 1,0	pH = 2,0	pH = 2,0	pH = 2,0	pH = 2,3

* PAB = P-aminobenzilceluloză; MABOM = m-aminobenziloximetilceluloză; CMC = carboximetilceluloză; ASB = albumină serică bovină; ASU = albumină serică umană; GGU = γ-globulină umană; OVG = ovalbumină de găină (anticorpii folosiți au fost obținuți de la iepure).

Scanned with OKEN Scanner

Puritatea preparatelor obţinute prin această tehnică variază în raport cu natura sistemului imun investigat, între 80 şi 95%. Randamentul preparării anticorpilor variază în raport cu gradul de dispersare al imunosorbentului folosit. De pe imunosorbenţi cu grad de dispersie mediu, recuperarea anticorpilor nu depăşeşte 50% (171) însă pentru imunosorbenţi cu un grad de dispersie mare, randamentul preparării anticorpilor este şi el mărit (172). Trebuie reţinut că cu cît intervalul de timp dintre fixarea anticorpului în coloană şi disociaţia lui este mai mic, cu atît randamentul obţinerii lui va fi mai mare.

În eluatele de anticorpi nu ajung cantităţi însemnate de proteine serice nespecifice, deoarece imunosorbenţii celulozici prezintă o absorbţie nespecifică mică. Astfel, diferite conjugate antigen-p-diazobenzoilceluloză au adsorbit nespecific între 1,5 şi 4,4 mg proteină/g, iar preparate obţinute cu ajutorul p-diazobenziloximetilceluloză cu diferite grade de dispersie au adsorbit nespecific între 0,25 şi 1,7 mg proteină/g conjugat-imunosorbent (66).

Aplicaţii. Pe pulbere de celuloză, prin intermediul radicalului clorurei de N-(m-nitrobenziloxi)-metilpiridiniu, au fost fixate numeroase antigene, ca : albumina serică de cal, albumina serică de om, ovalbumina etc. (64) (65) (131), care au permis obţinerea anticorpilor specifici într-o stare de înaltă puritate (peste 90%) cu un randament bun. Tot prin această tehnică s-au obţinut anticorpii contra virusului gripal A_1 într-o stare de puritate satisfăcătoare (132) precum şi antitoxină difterică (67).

Prin intermediul reacţiei diimidă s-au fixat de CM-celuloză albumina serică bovină, ovalbumina, γ-globulina bovină şi umană, hemoglobină, hemocianină, tripsină, fosfataze acide şi alcaline şi alte enzime (205). Este de notat că prin cuplare, enzimele şi-au păstrat activitatea. Au fost cuplate şi unele haptene ca acidul aminofenil-azofenilarsonic, ε-DNP-lizina, ε-N-(6-purinoil)-lizina etc. (205) (206).

Antigenele fixate de suporturi celulozice au fost folosite cu succes la elaborarea unei metode rapide de dozare a anticorpilor specifici din antiserurile mono- sau polivalente (63).

Disocierea anticorpilor antihaptenă şi eluţia lor din coloane cu imunosorbenţi poate fi realizată şi cu ajutorul soluţiilor de haptenă (112) (109). Se procedează astfel : haptena se fixează de celuloză direct sau prin intermediul proteinei purtătoare, se formează complexul imun prin introducerea anticorpilor antihaptenă, iar disocierea acestuia şi eluţia anticorpilor se realizează prin creşterea gradată a concentraţiei în haptenă. Pe această cale s-au separat în mai multe fracţiuni anticorpii anti-p-azobenzenarsonat (109). Celuloza s-a bromurat şi s-a eterificat cu resorcină, iar la compusul rezultat s-a adiţionat acid p-aminobenzenarsonic diazotat. Conjugatul format s-a introdus într-o coloană cromatografică şi prin el s-a trecut o soluţie de anticorpi anti-p-azobenzenarsonat. Disocierea complexului şi eluţia anticorpilor s-a realizat cu soluţii de haptenă (acid p-benzenarsonic) ale căror concentraţii au crescut treptat între valorile 10^{-6} şi 10^{-1}M, după procedeul eluţiei în etape. S-a colectat un număr mare de probe şi s-a determinat, prin spectrofotometrie la 280 mμ, conţinutul lor în anticorp. S-au obţinut curbe de developare cu mai multe piscuri distincte pentru fiecare fel de anticorpi antihaptenă eluaţi (fig. 63).

Acest procedeu separă moleculele de anticorp pe baza diferenţelor dintre raportul constantei lor de legare cu imunosorbentul şi cu haptena de eluţie. Anticorpii legaţi mai puternic

Scanned with OKEN Scanner

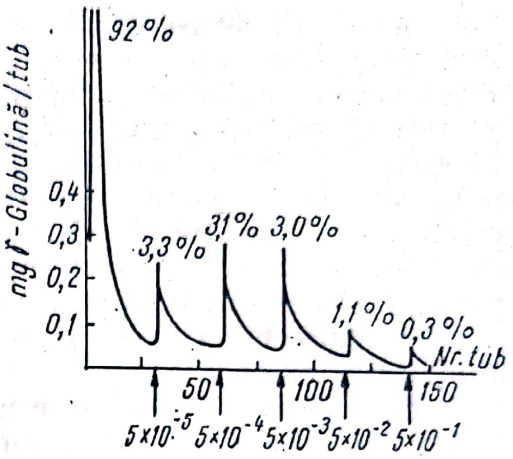


Fig. 63. — Eluția în etape a anticorpilor anti-p-benzen-arsonat cu acid p-benzenarsonic. Primul pisc cuprinde proteinele lipsite de activitate imunologică care nu sînt fixate pe imunosorbent (după U. P. Kreiter și colab., 1964).

de haptena liberă decît de cea legată de imunosorbent se eluează mai ușor și, invers, cei legați mai slab de haptena liberă decît de cea legată se eluează la urmă. Astfel s-au separat anticorpi care cer pentru eluție o concentrație de 10^5 mai mare de haptenă decît alți anticorpi. Eterogenitatea relevată prin această tehnică pare cauzată de variații ale structurii zonei de combinare a anticorpilor (109).

3. Absorbția antiserurilor *

Pentru efectuarea cercetărilor la nivelul antigenelor individuale este de multe ori necesar să se folosească antiseruri monospecifice, care conțin anticorpi numai față de antigenul studiat.

Majoritatea antiserurilor obținute în urma hiperimunizării animalelor sînt însă polispecifice, deci conțin alături de anticorpii cu specificitate dorită și anticorpi nedoriți, cu alte specificități. Anticorpii nedoriți apar în antiseruri datorită eterogenității materialului antigenic inoculat, datorită reacțiilor încrucișate (v. cap. I) sau chiar din cauza impurităților încă prezente în preparatul antigenic „purificat", folosit la hiperimunizare.

Separarea anticorpilor omologi [1] de anticorpii eterologi se realizează fie prin izolarea din antiser a anticorpilor omologi, fie prin îndepărtarea din antiser a anticorpilor eterologi (absorbția antiserurilor) (fig. 61). Ambele procedee se realizează prin reacții de imunoprecipitare. În primul caz se adaugă antiserului antigenul omolog și se prelucrează apoi complexul imun format, iar în al doilea caz se adaugă antigenul sau antigenele eterologe, se îndepărtează complexul imun format și se folosește antiserul rămas. Acesta va conține numai anticorpii omologi, capabili să reacționeze cu antigenul studiat.

Absorbția antiserurilor se realizează prin operații mai simple și care durează mult mai puțin decît izolarea anticorpilor. De aceea și pericolul de a altera activitatea imunologică a antiserurilor prelucrate prin absorbție este mai mic decît în cazul aplicării procedeelor imunochimice de izolare.

---

* Termeni echivalenți: epuizarea antiserurilor, despecifierea antiserurilor.

[1] Pentru a ușura exprimarea, în mod convențional s-au denumit omologi antigenul care se studiază și anticorpul corespunzător și eterologi anticorpii nedoriți și antigenele corespunzătoare.

Scanned with OKEN Scanner

Absorbţia antiserurilor (îndepărtarea anticorpilor ete o.ogi) pretinde însă prepararea *tuturor* antigenelor eterologe. Astfel, dintr-un antiser care conţine anticorpii nedoriţi *b* şi *c* (fig. 61), aceştia vor putea fi îndepărtaţi numai prin adăugarea antigenelor *B* şi *C* libere de orice urmă de antigen *A*. În caz contrar, se va îndepărta şi o parte, care poate fi însemnată, din anticorpii *a*, ceea ce poate compromite experienţa. Deci, o condiţie esenţială pentru efectuarea absorbţiei este obţinerea antigenelor eterologe. De multe ori însă nu se cunoaşte numărul acestor antigene, natura lor chimică sau prepararea lor fiind mai dificilă. În aceste cazuri, rămîne oportună aplicarea procedeului de izolare directă cu ajutorul antigenului omolog.

Serurile imune absorbite nu mai pot fi folosite la reacţia de fixare a complementului, deoarece complexul solubil antigen-anticorp pe care îl conţin fixează complementul. Pentru a înlătura caracterul anticomplementar al antiserurilor absorbite, trebuie îndepărtate complexele solubile antigen-anticorp. Eliminarea lor se realizează printr-o centrifugare de mare turaţie (110 000 g/2 ore) (163).

Din antiserul absorbit se poate izola fracţiunea γ-globulinică care conţine anticorpii precipitanţi. Cu acest prilej se pot înlătura proteinele inactive ale antiserului, o parte considerabilă din antigenele eterologe adăugate la absorbţie şi o parte din complexele solubile formate de antigenele cu anticorpii respectivi. Pentru izolarea γ-globulinelor se foloseşte una din metodele înfăţişate în paragraful I. Fracţiunea γ-globulinică este mai comod de utilizat decît antiserul absorbit, deoarece conţine anticorpi concentraţi de cîteva ori faţă de serul imun iniţial şi este lipsită de masa principală a substanţelor de balast, care perturbă, într-o măsură mai mare sau mai mică, analiza imunochimică.

În sfîrşit, trebuie reţinut să serurile absorbite sînt monospecifice numai în raport cu antigenul sub controlul căruia s-au preparat. Folosirea unor antigene suplimentare permite uneori să se evidenţieze noi categorii de anticorpi, care se manifestă în alte reacţii imunologice. Astfel, îndepărtarea din serul imun a anticorpilor faţă de antigenele *B* şi *C* care stau la dispoziţia experimentatorului (fig. 61) înseamnă că serul devine monospecific (anti-*A*) numai în raport cu antigenele *B* şi *C* sub controlul cărora s-a efectuat absorbţia. Dar, în antiser mai pot exista anticorpi şi faţă de alte antigene (*D*, *E* etc.) a căror prezenţă în materialul antigenic inoculat animalelor este ignorată de experimentator. În aceste cazuri, caracterul polispecific al antiserului este camuflat şi el se relevă numai prin experienţe suplimentare.

Tehnica de lucru. La formarea complexelor imune se pot utiliza antigene eterologe solubile sau antigene fixate pe un suport insolubil.

În primul caz se procedează astfel : la un volum fix de antiser ţinut la 37°C se adaugă, sub agitare, o cantitate dată de antigen eterolog, dizolvată într-un volum cît mai mic de soluţie salină fiziologică. Se lasă amestecul 30 min la termostat şi apoi 12—16 ore la frigider. Se centrifughează la 4°C timp de 30 min la 6 000 g. Supernatantul trebuie să fie perfect limpede, în caz contrar se mai ţine încă 12—48 de ore la frigider, pînă cînd în urma centrifugării super-

Scanned with OKEN Scanner

natantul devine limpede. Supernatantul se aduce apoi la 37°C şi i se adaugă o nouă cantitate (mică) de antigen eterolog. Dacă nu se constată precipitare, aceasta înseamnă că în cursul primei operaţii s-au îndepărtat toţi anticorpii indezirabili şi astfel absorbţia este încheiată. Dacă însă supernatantul precipită, se repetă operaţiile descrise mai sus, pînă cînd adăugarea unei cantităţi noi de antigen nu mai provoacă precipitarea. Excesul mic de antigen eterolog, care se realizează de obicei prin acest procedeu, nu împiedică reacţia anticorpului cu antigenul omolog sau cu antigenele înrudite.

Adăugarea antigenului în porţiuni mici are dezavantajul că poate prelungi prea mult operaţiile de absorbţie. De asemenea, adăugînd „la întîmplare" prima porţiune de antigen, se poate realiza un exces, ceea ce determină formarea complexelor imune solubile şi deci pierderea materialului. De aceea este preferabil ca absorbţia să se efectueze numai după trasarea curbei de precipitare cu antigenul eterolog, pe o parte alicotă a antiserului (fig. 62). Se determină astfel exact cantitatea de antigen eterolog care, adăugată la un volum dat de antiser, provoacă precipitarea întregii cantităţi de anticorpi indezirabili. Cantitatea de antigene calculată se măreşte cu aproximativ 5% pentru a realiza la imunoprecipitare un mic exces de antigen. Se dizolvă apoi într-un volum minim de soluţie salină fiziologică, pentru a nu dilua prea mult antiserul şi se adaugă la acesta într-o singură porţiune. În continuare, se procedează ca mai sus.

Adăugarea antigenului într-o singură porţiune este nu numai o cale mai rapidă pentru absorbţia antiserurilor, dar ea este şi mai sigură, deoarece exclude apariţia fenomenului Danysz[1]. Acest fenomen se manifestă la adăugarea cantităţii echivalente de antigen în porţiuni mici, ceea ce provoacă uneori apariţia unui exces de antigen şi formarea complexelor solubile.

La absorbţia antiserurilor cu ajutorul antigenelor eterologe fixate de suporturi insolubile pot fi folosite antigene adsorbite pe gel de hidroxid de aluminiu (9) şi pe pulbere de sticlă (193) sau antigene legate chimic cu celuloza (66). Antigenele pot insolubilizate şi prin procedee speciale care nu le modifică antigenicitatea (79). Aplicînd aceste procedee se elimină atît operaţia de determinare a concentraţiei optime de antigen eterolog, cît şi pericolul formării complexelor solubile antigen-anticorp şi a excesului de antigen.

Antigenele eterologe se leagă de imunosorbenţii celulozici, după tehnica descrisă în paragraful precedent, şi apoi conjugatul se suspendă în antiserul cercetat. După un contact de 1—2 ore la 37°C, se centrifughează amestecul şi se îndepărtează precipitatul depus. Dacă imunosorbentul a conţinut o cantitate suficient de mare de antigen eterolog, prin acest procedeu se îndepărtează din antiser toţi anticorpii eterologi, indezirabili. Deoarece adsorbţia nespecifică a imunosorbenţilor celulozici este mică, prin acest procedeu nu se pierde decît o cantitate neînsemnată din anticorpii omologi.

Un procedeu mai simplu este absorbţia cu antigene eterologe pe gel de hidroxid de aluminiu (9) : 1 volum de gel de hidroxid de aluminiu (36 mg/ml) se amestecă cu 2 volume de soluţie de antigen eterolog şi 3 volume de soluţie salină fiziologică. Concentraţia antigenului în soluţie trebuie astfel aleasă încît gelul să adsoarbă aproape toată cantitatea de antigen. Se agită 10 min şi apoi se centrifughează. În supernatant se controlează prezenţa antigenului

[1] Danysz a observat că dacă toxina (antigen) se adaugă la antitoxină (anticorp) într-o cantitate care duce la formarea unui amestec neutru, neutralizarea se produce numai dacă întreaga cantitate de toxină este adăugată deodată la antitoxină. Dacă aceeaşi cantitate de toxină se adaugă în porţiuni mici, cu intervale între fiecare porţiune, amestecul rămîne toxic.

prin precipitare cu acid sulfosalicilic 20%. Masa de gel depusă se suspendă în aproximativ 10 volume de antiser şi se lasă să stea 1 oră la 37°C şi apoi 2 ore la 4°C. Se centrifughează la rece, şi se îndepărtează sedimentul care conţine anticorpii nedoriţi. Supernatantul limpede trebuie să conţină numai anticorpii omologi. Dacă în supernatant se constată totuşi prezenţa anticorpilor eterologi, se repetă operaţia. Aplicarea aceastei metode nu este lipsită însă de pericole: complexul antigen eterolog-gel poate adsorbi nespecific şi o parte din anticorpii omologi şi astfel se produc pierderi, care pot fi însemnate, de material imunologic activ. Pentru a evita acest neajuns, trebuie saturată complet capacitatea de adsorbţie a gelului cu antigenul eterolog. O saturare completă a gelului se constată dacă în supernatant este prezentă doar o mică cantitate de antigen. De asemenea, în cursul absorbţiei antiserului cu masa de antigen -gel trebuie păstrat raportul 1 volum de antigen-gel/10 volume de antiser.

Controlul absorbţiei. Absenţa anticorpilor eterologi în antiserul absorbit nu se demonstrează numai prin incapacitatea de a produce o nouă precipitare la adăugarea unei cantităţi suplimentare de antigen eterolog. Această constatare trebuie întregită prin efectuarea unor reacţii calitative, sensibile, de detectare a anticorpilor. În acest scop se pot folosi cu bune rezultate, testul inelului şi difuzia în gel. Numai dacă antiserul absorbit nu dă o reacţie pozitivă cu antigenul eterolog prin testul inelului sau metoda difuziei în gel este un semn sigur că absorbţia s-a făcut corect şi că analiza imunochimică poate fi efectuată cu acest antiser.

Prin metoda difuziei în gel (în special dubla difuzie) poate fi evidenţiat în antiserul absorbit şi antigenul eterolog, dacă acesta s-a adăugat în cantitate prea mare. În acest caz, antiserul neabsorbit reacţionează cu antiserul absorbit, formînd una sau mai multe linii de precipitare.

Aplicaţii. Procedeul de absorbţie este larg utilizat în analiza imunochimică. El serveşte la studiul reacţiilor încrucişate dintre două antigene individuale purificate, la evidenţierea antigenului sau a antigenelor posedate în comun de sisteme antigenice complexe, la identificarea antigenelor individuale în amestecuri naturale complexe, la eliminarea din antiseruri a anticorpilor care perturbă analiza imunochimică dată etc.

Absorbţia antiserurilor însoţeşte întotdeauna metoda de analiză aplicată, conferindu-i o mai mare capacitate de rezoluţie. Astfel, identificarea unui antigen dat dintr-un amestec complex se realizează cu mare siguranţă dacă metoda de imunodifuzie folosită se completează cu absorbţia antiserului.

În imunoelectroforegrama proteinelor serice de om (amestecul antigenic) developată cu antiserul de cal polispecific corespondent, identificarea liniilor de precipitare aparţinînd globulinelor din sistemul gamma, se efectuează uşor dacă se folosesc în paralel şi antiseruri absorbite (fig. 64).

Prin dispariţia liniei de precipitare corespunzătoare tipului de γ-globulină folosit la absorbţie, se identifică prezenţa lui în sistemul imun complex proteine serice de om — anticorpi de cal corespunzători. Desigur, pentru această operaţie experimentatorul trebuie să dispună de cele trei tipuri de γ-globulină purificate. Absorbţia antiserurilor şi analiza lor prin imunodifuzie a fost principala cale experimentală prin care s-au identificat componentele antigenice ale serurilor, aflate în cantităţi prea mici pentru a putea fi decelate prin metodele fizico-chimice curente (78) (55) (20).

Scanned with OKEN Scanner

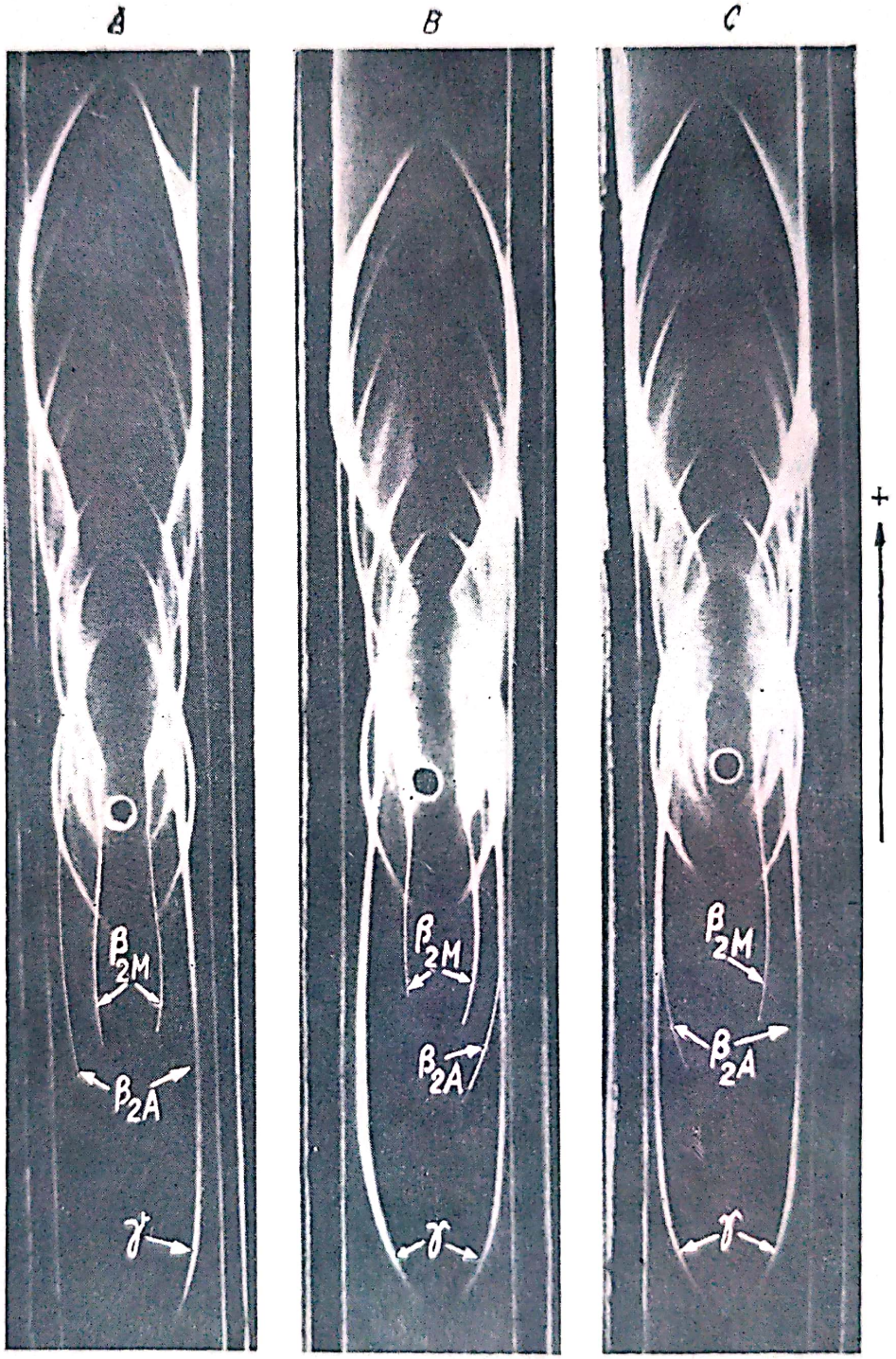


Fig. 64. — Analiza imunoelectroforetică a proteinelor serice de om cu antiserul de cal corespunzător, absorbit şi neabsorbit (după J. Heremans, 1961). *A*, Antiser absorbit cu γG-globulină, comparat cu acelaşi antiser neabsorbit; *B*, antiser absorbit cu γA-globulină, comparat cu acelaşi antiser neabsorbit; *C*, antiser absorbit cu γM-globulină, comparat cu acelaşi antiser neabsorbit; antiser absorbit (şanţul din stinga); antiser neabsorbit (şanţul din dreapta) (γ = γG; β_2A = γA; β_2M = γM).

Scanned with OKEN Scanner

III. FRAGMENTAREA ANTICORPILOR

După izolare şi purificare, anticorpii pot fi supuşi unor operaţii suplimentare de caracterizare, prin care se determină clasa de γ-globuline căreia îi aparţin anticorpii preparaţi, măsura în care metodele de obţinere aplicate au alterat proprietăţile fizico-chimice şi imunochimice şi dacă eterogenitatea constatată reflectă eterogenitatea populaţiei moleculare cercetate sau este cauzată de artefacte care rezultă din procesul de preparare. Astfel s-a observat că γG-globulinele păstrate chiar la temperatura frigiderului (0—4°C) prezintă o eterogenitate imunoelectroforetică rezultată în urma unei proteolize spontane (fig. 32) (181) (3) (90). Numai păstrarea preparatelor îngheţate la —20°C evită apariţia acestor artefacte.

După stabilirea clasei de imunoglobuline la care aparţin anticorpii studiaţi, realizată de obicei prin tehnica imunoelectroforetică (fig. 64), se fragmentează molecula în subunităţi cu greutăţi moleculare mai mici. Pe aceste fragmente se determină caracteristicile structurale şi antigenice, precum şi localizarea zonelor de combinare.

Sînt două metode eficiente de fragmentare a moleculei de γ-globuline : hidroliza enzimatică şi reducerea legăturilor disulfidice intercatenare. Modul în care se fragmentează molecula γG-globulinelor (singura clasă mai bine studiată) în urma diferitelor tratamente este redată schematic în figura 65 (45).

1. Hidroliza enzimatică (158) (159) (161) (1)

Digestia enzimatică cu papaină a γG-globulinelor de iepure scindează molecula în trei fragmente care, luate împreună, reprezintă peste 90% din molecula originală şi care conservă aproape integral proprietăţile imunologice ale preparatului iniţial. Aceste trei fragmente au fost separate prin cromatografie pe CM-celuloză (fig. 66).

Fragmentele care ies primele din coloană se notează *Fab*, iar ultimul *Fc* [1]. Fragmentele *Fab* au o greutate moleculară de aproximativ 40—50 000, iar fragmentul *Fc* are o greutate moleculară în jur de 50—60 000 (14).

La celelalte specii cercetate (păsări, şoareci, şobolani, cobai, cal, bou, om) analiza hidrolizatului relevă numai două componente, unul *Fab* şi altul *Fc* (84) (160). S-a arătat că o moleculă de γG-globulină este alcătuită din două fragmente *Fab* şi unul *Fc*. Diferenţa dintre iepure şi celelate specii constă în aceea că la acesta, cele două fragmente *Fab* pot fi separate unul de celălalt prin cromatografie (159) şi electroforeză în gel de amidon (161) sau agaroză (175). Principalele proprietăţi fizico-chimice şi imuno-

[1] Această nomenclatură nouă a fragmentelor de hidroliză enzimatică corespunde următorilor termeni, încă frecvent întîlniţi în literatură : *Fab* = *I* sau *II* (159) = *S* (31) = *A* sau *C* (47); *Fc* = *III* (159) = *F* (31) = *B* (84) (47) (190).

Scanned with OKEN Scanner

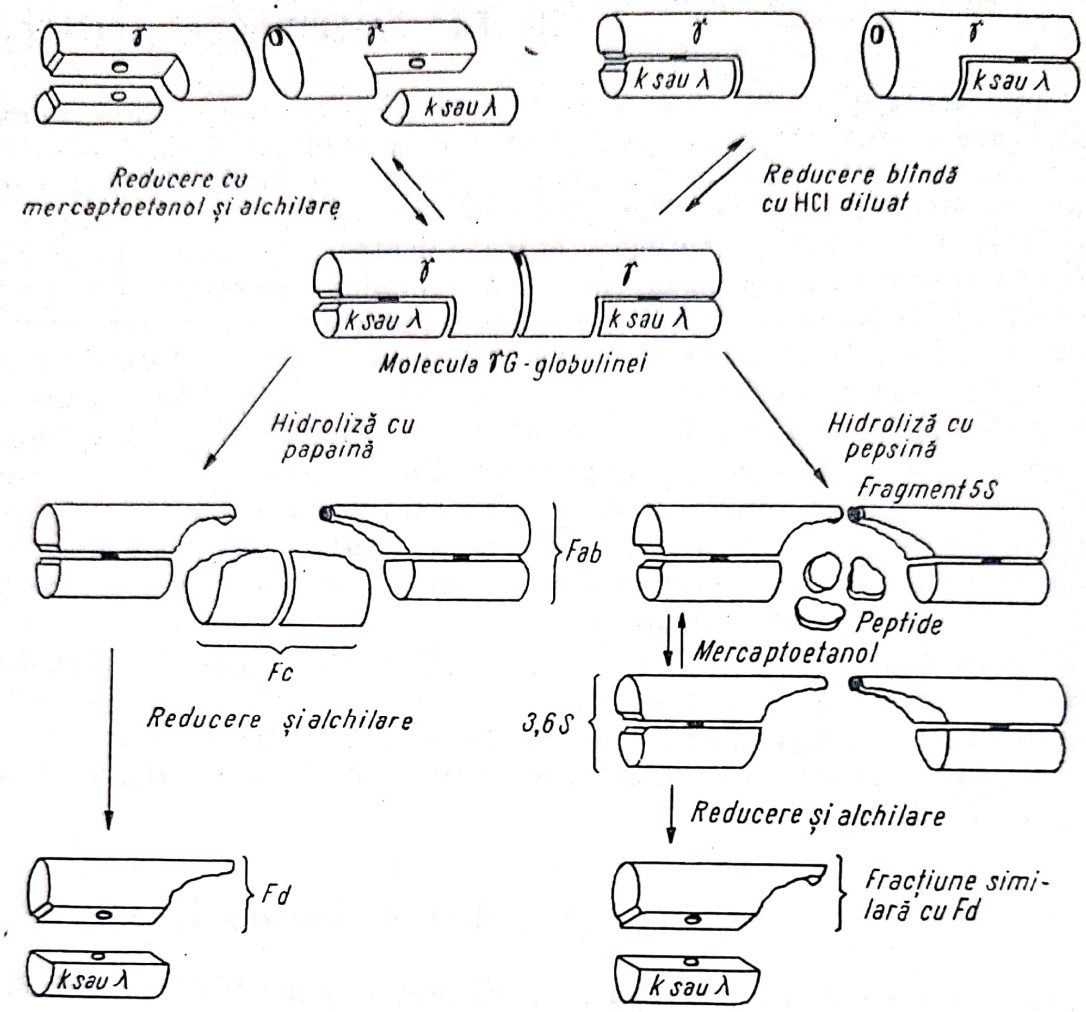


Fig. 65.—Schema desfacerii moleculei γG-globulinelor sub influența enzimelor proteolitice și a agenților de reducere a grupărilor disulfidice (după M. Fougereau și colab., 1965).

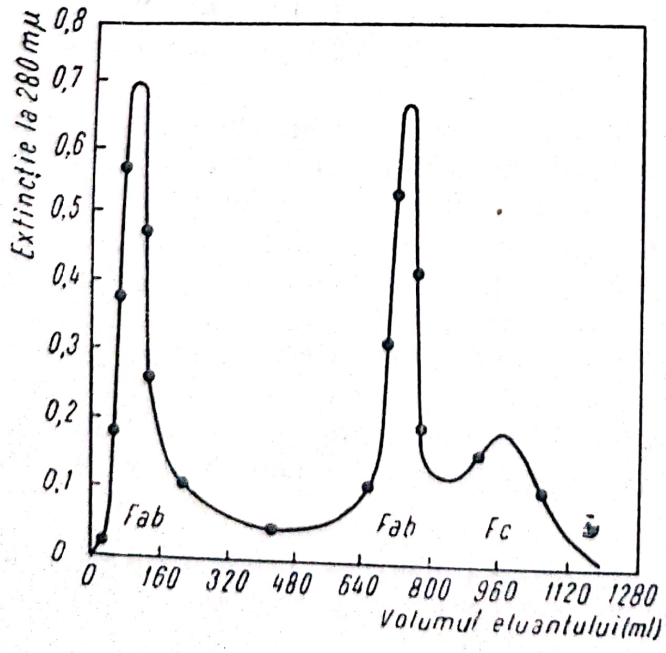


Fig. 66. — Cromatografia pe CM-celuloză a γG-globulinelor de iepure după digestia enzimatică cu papaină (după R. R. Porter, 1959).

Scanned with OKEN Scanner

chimice ale fragmentelor obținute prin hidroliza cu papaină sînt redate în tabelul nr. 25

TABELUL NR. 25

Proprietățile fragmentelor obținute prin hidroliza cu papaină a γG-globulinelor de iepure, om și șoarece (adaptat după J. L. Fahey, 1962)

Proprietatea	Iepure			Om și șoarece	
	Fab (I)	*Fab (II)*	*Fc (III)*	*Fab (S)*	*Fc (F)*
Cantitatea din proteina totală	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3
Greutatea moleculară	50 000	53 000	80 000	34—50 000	50 000
Coeficient de sedimentare ($s_{20,w}$)	3,6S	3,55S	3,4S	3,5—3,9S	3,4—3,9S
Mobilitate electroforetică spre anod (pH 8,6)	cel mai rapid	intermediar	cel mai lent	lent	rapid
Aminoacizi N-terminali	alanină	alanină	diferiți		
Conținutul în hexoze (% din proteină)	0,6	0,15	0,9	0,1—0,3	2,5—3,1
Grupări determinante:					
— caracteristice γG-globulinelor	0	0	+	0	+
— comune cu γA- și γM-globuline	+	+	0	+	0
Zone de combinare	+	+	0	+	0

Digestia cu pepsină a γG-globulinelor de iepure determină formarea unui produs intermediar, cu dimensiuni moleculare mai mici ($S_{20,w}$ = = 5S) și care este alcătuit din două fragmente *Fab* legate unul de celălalt (vezi fig. 65). Fragmentul *Fc* este distrus sub acțiunea papainei (142) (52). Cele două fragmente *Fab* sînt unite printr-o legătură disulfidică (143) (45) (18), care poate fi ruptă prin adiție de cisteină. Se separă cele două fragmente *Fab* cu coeficientul de sedimentare 3,4 S.

Dacă se hidrolizează cu papaină un anticorp de tip γG se constată că fragmentul *Fab* își păstrează capacitatea de combinare cu antigenul corespunzător cu toate că el nu mai este capabil să-l precipite. Incapacitatea fragmentului *Fab* de a precipita antigenul corespondent este considerată ca un semn că el este univalent. Deci, hidroliza cu papaină desparte cele două zone de combinare prezente pe o moleculă intactă de anticorp în două fragmente *Fab*. Într-adevăr, numărul mediu al locurilor de combinare pe o moleculă de fragment *Fab*, determinat prin capacitatea de legare a haptenelor, este de 0,9—1,0, semn că fragmentele active produse de papaină sînt univalente (142) (137) (139). Acțiunea pepsinei produce apariția fragmentelor cu coeficient de sedimentare 5S, care păstrează ambele zone de combinare a anticorpului și își mențin deci capacitatea de a precipita cu antigenul corespunzător (140) (144) (115) (136).

Scanned with OKEN Scanner

2. Reducerea legăturilor disulfidice

Dacă γG-globulinele umane sînt reduse cu mercaptoetanol în soluţii apoase neutre se rup *cel mult* 5 legături disulfidice (57) (96). Dacă imunoglobulina redusă este dializată faţă de acid acetic sau propionic N şi apoi trecută peste o coloană de Sephadex G-75 se separă în doi componenţi iar pe G-200 în trei componenţi (43) (fig. 67).

Componentul care părăseşte primul coloana cromatografică are greutate moleculară de 50—55 000 şi a fost notat *H*, iar celălalt, cu greutate moleculară mai mică 20—25 000 a fost numit *L*. Pe baza acestor date s-a ajuns la concluzia că γG-globulinele diferitelor specii au o structură tetrapolipeptidică, fiind alcătuite din două lanţuri γ şi două lanţuri κ sau λ (30) (33) (32) (v. şi cap. V/I).

Principalele proprietăţi fizico-chimice şi imunochimice ale celor două lanţuri polipeptidice sînt cuprinse în tabelul nr. 26.

Lanţurile *grele* şi *uşoare* ale γG-globulinelor sînt distincte din punct de vedere antigenic, prezentînd reacţii de neindentitate cu un ser imun anti-γG-globulină. Dacă se testează reacţia acestor lanţuri cu un antiser preparat faţă de fragmentele papainice *Fab* şi *Fc* se constată că antiserul anti-*Fab* reacţionează atît cu lanţul greu, cît şi cu cel uşor, în timp ce un ser anti-*Fc* reacţionează numai cu lanţul greu (fig. 68) (43).

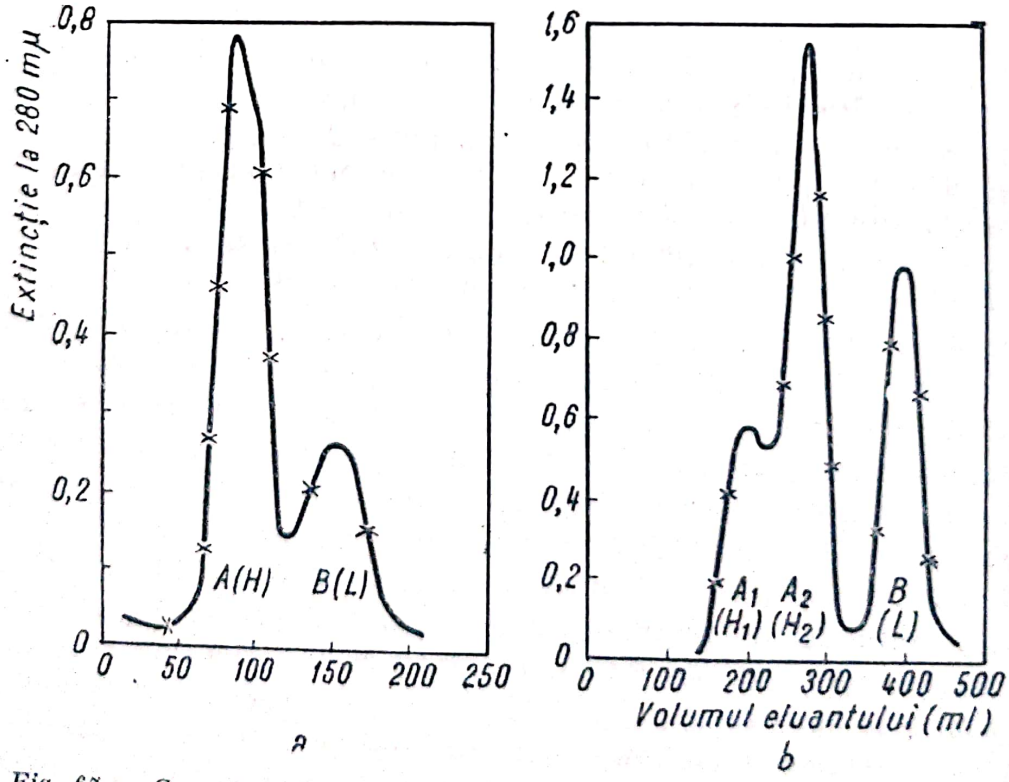


Fig. 67. — Cromatografia γG-globulinelor umane pe gel de Sephadex G-75 (a) şi G-200 (b), după reducere cu mercaptoetanol (după S. Cohen, 1963).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL NR. 26

Proprietăţile fragmentelor polipeptidice obţinute prin reducerea legăturilor disulfidice ale γG-globulinelor (adaptat după R. R. Porter, 1963; J. B. Fleischman şi colab., 1962; M. Metzger şi colab., 1964)

Proprietatea	Fragmentul		Specia
	lanţul greu (H,A)	lanţul uşor (L,B)	
Cantitatea din proteina totală	75	25	iepure
	73—76	24—29	om
	60	40	diferite
Greutatea moleculară	50—60 000	20—25 000	iepure
	52 000	20 000	om
	53—58 000	27—30 000	diferite
Coeficient de sedimentare ($s_{20,w}$)	1,853	1,659	„
Mobilitate electroforetică	lent	rapid	om, iepure
Aminoacizi N-terminali:			
alanină	0,05	0,4	iepure
acid aspartic	0,02	0,1	„
Conţinutul în glucide (mol/mol):			
hexoze	4,5	0,27	„
hexozamină	4,0	0,16	„
acid sialic	4,41	0,0 (0,01)	„
Grupări determinante:			
— caracteristice γG-globulinelor	+	0	om, iepure
— comune cu γA- şi γM-globuline	0	+	om, iepure
Zone de combinare	+	0	cal
	0	+	iepure
	+	+	cobai

Aceste rezultate arată că fragmentele *Fab* conţin lanţul ϰ sau λ şi o parte din lanţul γ, iar fragmentul *Fc* este alcătuit din resturile lanţului γ. Partea din lanţul γ conţinută în fragmentul *Fab* se mai numeşte şi *Fd* şi poate fi obţinută prin reducerea fragmentului *Fab* (45) (77). Pe baza acestor corelaţii şi pe altele care sînt schematizate în figura 65 s-a postulat structura tetracatenară a γG-globulinelor în concordanţă cu majoritatea datelor fizico-chimice (151), chimice (21) şi imunochimice (169) (119) cunoscute pînă în prezent.

Lanţurile uşoare se leagă de cele grele prin intermediul unei singure punţi disulfidice. Numărul legăturilor peptidice care unesc lanţurile γ este încă nesigur. După unii autori ar fi trei legături disulfidice (18), după alţii una singură (146). Ultima părere se bazează pe observaţia că γG-globulina de iepure poate fi scindată în două subunităţi cu dimensiuni aproximativ egale, prin reducere blîndă şi acidifiere (153) (145) (154). Scindarea moleculei se realizează prin ruperea unei singure legături disulfidice; cele două jumătăţi de moleculă conţin fiecare un lanţ γ şi ϰ sau λ intact

(fig. 65). Trebuie notat însă că o treime din moleculele de γG-globuline nu se desfac prin ruperea unei legături disulfidice şi că fragmentul *Fc* nu poate fi desfăcut în două fără o reducere prealabilă (18).

Structura chimică a celorlalte două clase de imunoglobuline este asemănătoare cu cea găsită pentru γG-globuline. S-a arătat că prin reducerea şi fracţionarea γM şi γA-globulinelor se obţin de asemenea lanţuri polipeptidice grele şi uşoare (151) (34). Grupările determinante comune celor trei clase de γ-globuline au fost găsite pe lanţurile uşoare, iar cele specifice pe lanţurile grele (200) (148). Pe baza acestor date s-au putut alcătui formulele moleculare ale imunoglobulinelor (v. cap. V/I). Anticorpii γM au şase zone de combinare/moleculă şi pot fi disociaţi, cu agenţi reducători, în subunităţi cu o constantă de sedimentare 6 S. Aceste subunităţi sînt capabile să se unească cu antigenul corespondent fără a prezenta însă reacţia de precipitare. Din acest motiv se consideră că subunităţile posedă o singură zonă de combinare în moleculă, adică sînt univalente.

3. Procedee experimentale

HIDROLIZA CU PAPAINĂ A γG-GLOBULINELOR ŞI SEPARAREA FRAGMENTELOR OBŢINUTE.

Tehnica (161). Se prepară o soluţie de γG-globulină 1 g% în tampon acid acetic-acetat, 0,1 M, pH 5,5. La soluţia proteică se adaugă, ca activator, cisteină şi EDTA, pînă la o concentraţie finală de 0,01 M cisteină şi 0,002 M EDTA. Se introduce apoi papaina cristalizată în raport de 1 mg enzimă/100 mg γG-globulină. După dizolvarea papainei se ţine amestecul într-un termostat, la 37°C, timp de 5—16 ore. Hidroliza se opreşte dializînd amestecul faţă de apa distilată, la rece, 24 de ore, cu schimbarea repetată a apei (159). Se elimină astfel activatorii (cisteina, EDTA) şi papaina se inactivează.

Acţiunea papainei poate fi blocată instantaneu, adăugînd amestecului p-cloromercuribenzoat pînă la o concentraţie finală de 0,001 M (84).

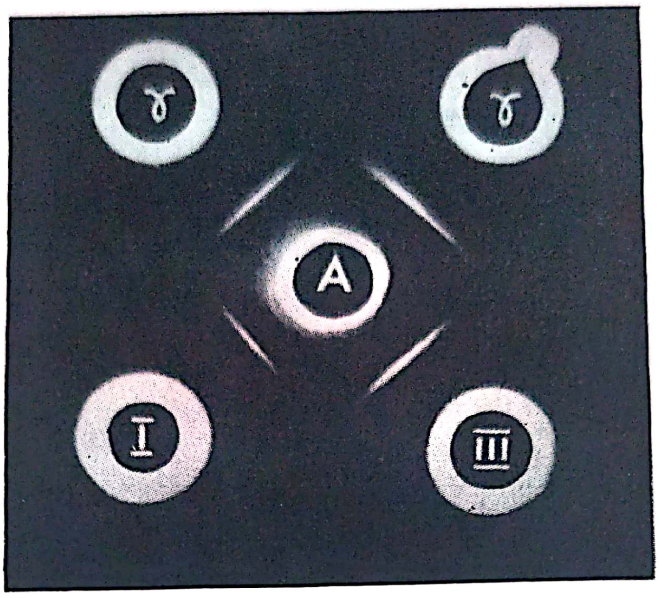
Blocarea acţiunii enzimatice prin dializă este mai avantajoasă, deoarece se realizează concomitent şi îndepărtarea activatorilor, tamponului şi a peptidelor dializabile, rezultate în urma hidrolizei. Dacă hidrolizatul nu se fracţionează imediat, el poate fi păstrat sub formă liofilizată, fără alterarea proprietăţilor fizicochimice şi imunochimice ale subunităţilor pe care le conţine (175).

Precizări. Condiţiile de hidroliză prezentate mai sus sînt cele optime pentru fragmentarea γG-globulinelor de iepure. Ele pot fi folosite, cu egal succes, şi la hidroliza γG-globulinelor de altă provenienţă (160). Este posibilă însă şi schimbarea condiţiilor de hidroliză, în anumite limite, aşa cum rezultă din figura 69.

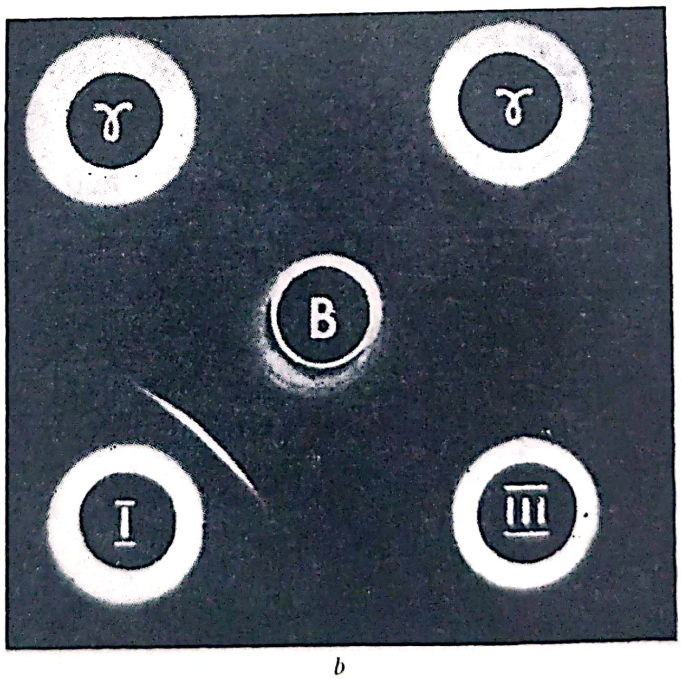
Astfel, se pot folosi diferite tampoane, ca: fosfat 0,01 M pH 7,0 (159) şi fosfat 0,09 M-clorură de sodiu 0,05 M, pH 7,5 (141) pentru γG-globulinele de iepure şi fosfat 0,1 M, pH 6,0 pentru cele de om (84). În general, oricare alt tampon, cu pH-ul cuprins între 5,0 şi 6,2, dă rezultate bune.

Raportul enzimă/proteină poate, de asemenea, creşte pînă la 2,0 mg papaină/100 mg γG-globulină. Acest raport este în bună măsură dependent de calitatea preparatului de papaină folosit. Pentru papaină pură, de două ori cristalizată, cu o activitate specifică mare, raportul enzimă/proteină nu trebuie să depăşească 1 : 100.

Scanned with OKEN Scanner



a



b

Fig. 68. — Reacția lanțurilor H (a) și L (b) obținute din γG-globulina de iepure, cu serul imun de capră, anti-γG-globulină de iepure și anti-fragmentele Fab și Fc din γG-globulinele de iepure (după J. B. Fleischman și colab., 1962). γ = ser anti-γG-globulină de iepure; A = lanțul greu H; B = lanțul ușor L; I = fragmentul Fab; III, = fragmentul Fc.

Scanned with OKEN Scanner

În sfîrşit, se poate folosi şi un timp de hidroliză mai scurt de 5 ore, dar în acest caz nu este hidrolizată întreaga cantitate de γG-globulină, care este încă prezentă în amestecul final în proporţii variabile (46% la 17 min, 24% la 30 min şi 13% la 1 oră).

Analiza şi separarea fragmentelor. Izolarea fragmentelor *Fab* şi *Fc* la γG-globulinele de iepure sau la celelalte specii poate fi realizată prin cromatografia pe CM-celuloză sau DEAE-celuloză şi prin electroforeza pe gel de amidon a hidrolizatului papainic.

Cromatografia pe CM-celuloză a produşilor de scindare se efectuează în tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 5,5. Molaritatea acetatului este ridicată treptat, după eluarea fragmentului *Fab* de la 0,01 M la 0,9 M (fig. 66). Gradientul este liniar şi poate fi realizat prin folosirea unui vas rezervor de formă conică şi a unui vas de amestecare de formă sferică. Raportul volum con-sferă este de 1 : 2 (159). Analiza se efectuează la temperatura camerii. Fracţiunile apropiate se contopesc, se dializează faţă de apă distilată sau faţă de tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0 (fragment *Fab*), tampon acetat-acid clorhidric 0,04 M, pH 5,0 (fragmentul *Fc*) şi se liofilizează (175).

Înainte de introducerea în coloană, hidrolizatul trebuie să fie echilibrat faţă de tamponul acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5 printr-o dializă de 24 de ore. Dacă hidrolizatul a fost liofilizat, el se dizolvă direct în acest tampon.

Cromatografia pe DEAE-celuloză se efectuează în mod asemănător, pentru eluţie fiind folosiţi tamponul fosfat cu gradient variabil de la 0,05 M la 0,3 M, pH 8,0 (47) (37) sau tamponul TRIS-acid clorhidric 0,02 M, pH 8,0 cu un gradient de clorură de sodiu variind pînă la 0,3 M (27).

La separarea cromatografică a hidrolizatelor obţinute din alte γG-globuline decît cele de iepure se obţin numai două maxime, primul corepunzător fragmentului *Fab* (*S*), iar al doilea fiind alcătuit din fragmentul *Fc* (*F*).

În general, fragmentele *Fab* izolate prin cromatografie pe CM-celuloză sau DEAE-celuloză sînt impurificate cu o anumită cantitate de γG-globulină, care este cu atît mai mare, cu

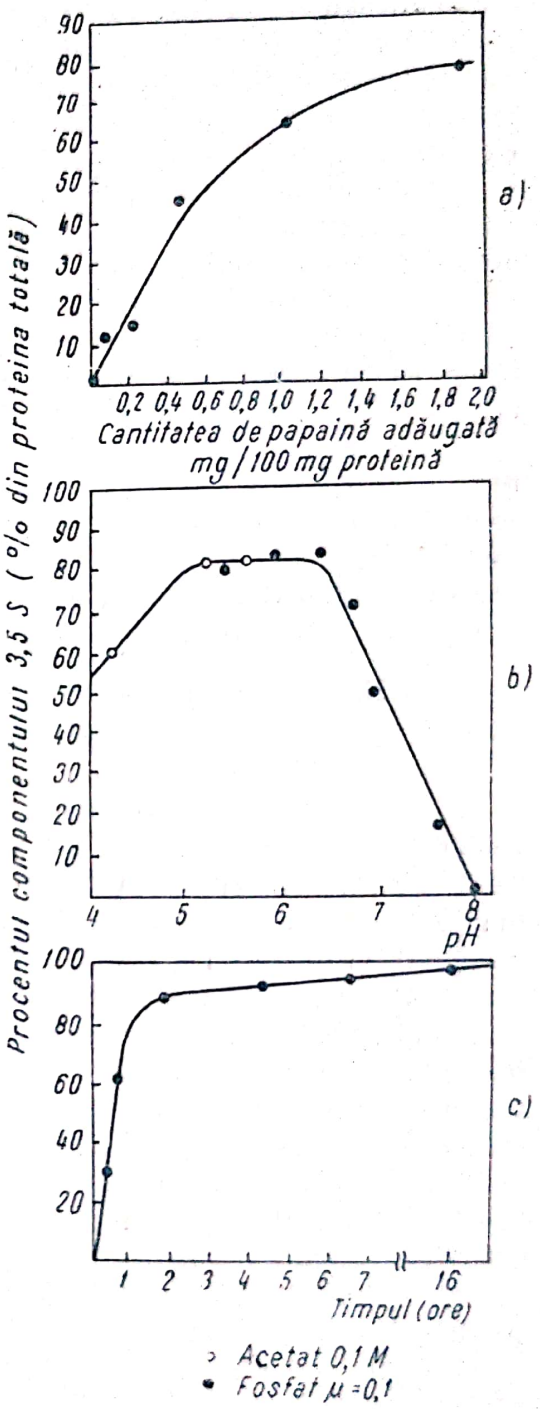


Fig. 69. — Condiţiile de hidroliză a γG-globulinelor de iepure cu papaină, determinate prin apariţia componenţilor 3,5 S (după F. W. P u t n a m, 1962). a, Efectul raportului papaină/ proteină asupra fragmentării γG-globulinelor la pH 6,0; b, pH-ul optim pentru scindarea γG-globulinelor; c, fragmentarea γG-globulinelor la pH 5,5 în funcţie de timpul de incubaţie.

Scanned with OKEN Scanner

cît durata hidrolizei a fost mai scurtă. Îndepărtarea se realizează prin filtrarea preparatului care conține fragmentul *Fab* pe gel de Sephadex G-200 (195). Eluția se realizează cu clorură de sodiu 0,1 M adusă la pH 8,0 cu tampon fosfat 0,01 M. Se obțin două piscuri : primul (aproximativ 30%) conține γG-globulina intactă, iar al doilea (aproximativ 70%) fragmentul *Fab* cu un coeficient de sedimentare 3,5S. Puritatea preparatului astfel obținut depășește 99%.

Electroforeza servește mai mult pentru a urmări efectul hidrolizei enzimatice decît pentru separarea fragmentelor obținute. Electroforeza se efectuează în gel de amidon (159) sau agaroză (175), folosind un tampon acetat 0,05 M, pH 5,5.

Analiza prin imunodifuzie a hidrolizatului, efectuată cu un antiser preparat față de γG-globulina intactă, demonstrează structura antigenică diferită a fragmentelor *Fab* și *Fc* (liniile lor de precipitare se întretaie) și înrudirea lor cu γG-globulina din care provin (liniile lor formează un pinten) (fig. 70).

Cristalizarea fragmentului Fc (159). Eluatele din fracțiunea cromatografică *Fc* se contopesc, se dializează față de apa distilată și se liofilizează. Se face o soluție concentrată în acid acetic 0,02 N și se dializează la rece (2°C) fața de o soluție tampon de fosfat cu pH 6,0—7,0, 0,005 M. În aceste condiții apar cristale, adesea cu dimensiuni mari, care se depun pe membrana de dializă. Recristalizarea se poate repeta de cîteva ori.

Hidroliza cu pepsină a γG-globulinelor și separarea fragmentelor obținute

Tehnica (141) (155). Se prepară o soluție de γG-globulină 2—3 g% în tampon acetat de sodiu 0,07 M — clorură de sodiu 0,05 M, pH 4,5. La soluția proteică se adaugă pepsină cristalizată în raport de 2 mg enzimă/100 mg γG-globulină. Se ține amestecul în termostat la 37°C timp de 6—18 ore. Hidroliza se oprește ridicînd pH-ul la 8,0 și dializînd apoi amestecul față de o cantitate mare de tampon borat-clorură de sodiu, pH 8,0 $\mu = 0{,}16$ [1].

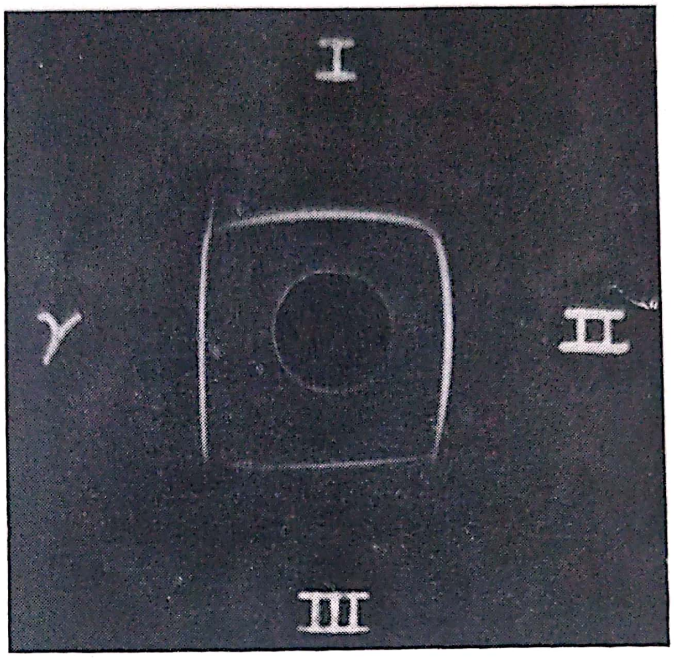
Izolarea fragmentului 5S (143) (140). Peste hidrolizatul peptic dializat se adaugă, la temperatura camerei, o cantitate de sulfat de sodiu astfel aleasă ca să se realizeze o concentrație finală de 12,5% (g/v). În aceste condiții precipită γG-globulinele rămase intacte. După centrifugare și îndepărtarea precipitatului, în supernatantul limpede se mai adaugă atît sulfat de sodiu cît să se crească concentrația lui pînă la 19%. Proteina care precipită în intervalul 12,5 —19%, examinată prin ultracentrifugare, prezintă un singur maxim cu un $S_{20,w} = 5{,}1$. Randamentul obținerii fragmentului variază de la preparat la preparat, reprezentînd între 40 și 60 % din cantitatea de γG-globulină inițială supusă hidrolizei.

Precizări. Fragmentul 5S nu poate fi separat de molecula intactă prin cromatografie pe CM-celuloză în condițiile indicate la hidroliza cu papaină, deoarece se produce spontan scindarea lui în două fragmente 3,5S, identice cu cele obținute prin hidroliza cu papaină a γG-globulinelor.

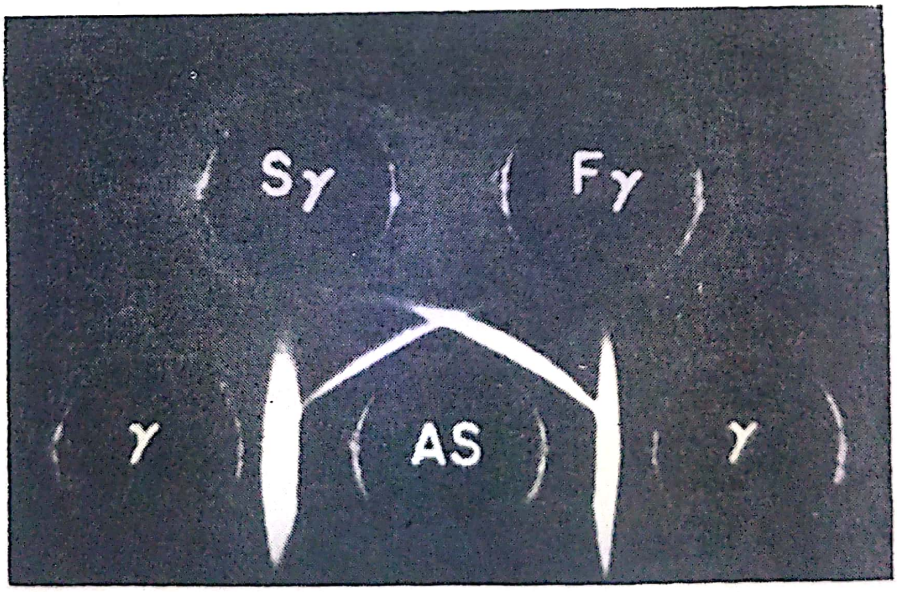
Scindarea cantitativă a fragmentului 5 S în două componente *Fab* poate fi realizată astfel : peste hidrolizatul peptic, adus la pH 7,0, se adaugă cisteină solidă sau un alt agent reducător (2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamină hidroclorică, tioglicolat de sodiu etc.) pînă la o concentrație de 0,01 M. Se incubează apoi amestecul la 37°C timp de 16 ore, se face o dializă exhaustivă față de tamponul acetat 0,01 M, pH 5,5 și se analizează apoi prin croma-

[1] Se dizolvă 8 g NaCl și 12,49 H_3BO_3 în apă distilată. Se ajustează pH-ul la 8,0 cu Na OH 5N și apoi se aduce la 1 000 ml cu apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner



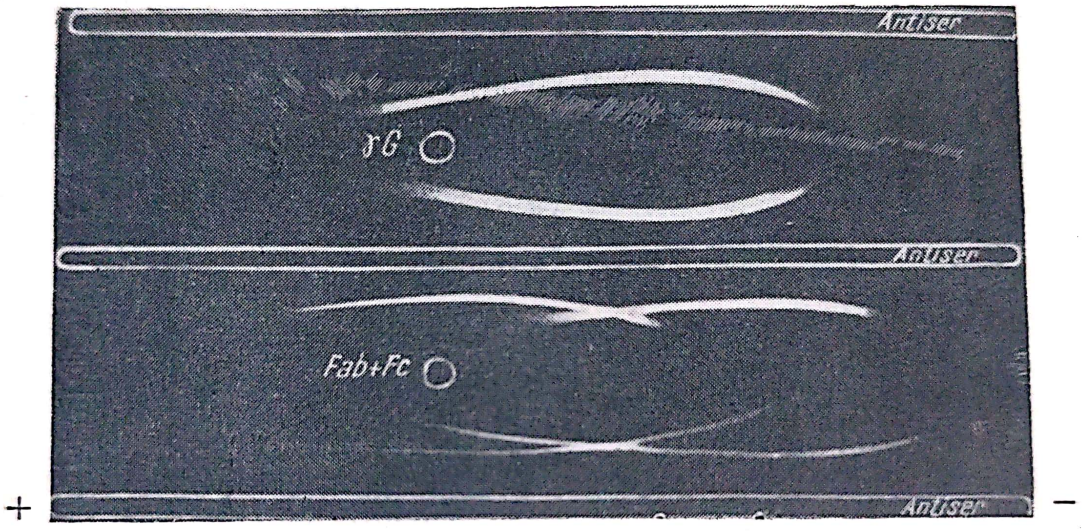
a, *Iepure* (*după F. W. P u t n a m, 1962*) ;



b, *om* (*după J. L. F a h e y, 1963*) (γ = *γG-globulină nehidrolizată* ; *I, II, S = Fab, III, F = Fc* ; *AS = antiser*) ;

Fig. 70. — Analiza comparativă prin imunodifuziune a γG-globulinei hidrolizate şi nehidrolizate.

Scanned with OKEN Scanner



c, *om, imunoelectroforeza.* Linia de precipitare din zona catodică este constituită din fragmentul *Fab* (după J. H e r e m a n s, 1961).

tografie pe schimbători de ioni sau electroforeză în gel. Analizele relevă, de obicei, prezența fragmentului *Fab* alături de o mică cantitate din fragmentul 5S și γG-globulina intactă (155).

În urma hidrolizei peptice, nu apare niciodată fragmentul *Fc*, deoarece este atacat de pepsină, pe măsură ce acesta se formează, fiind degradat în fragmente mai mici. Datorită acestei proprietăți, pepsina poate fi folosită la fragmentarea mai avansată a subunităților papainice *Fc* (52).

Disocierea moleculelor de γG-globulină și izolarea lanțurilor polipeptidice (43) (122)

Tehnica (122). Se prepară o soluție de γG-globulină (20 mg/ml) în tampon TRIS—HCl 0,5 M, pH 8,2. Se adaugă un volum de 2-mercaptoetanol astfel calculat ca în soluția proteică să se realizeze o concentrație de 0,5 M agent reducător (se pot folosi cu egal succes și alte concentrații cuprinse între 0,1 și 0,95 M). Se lasă să stea la temperatura camerei o oră, se răcește în gheață și se adaugă un volum egal de iodacetamidă 0,5 M răcită (în tampon TRIS—HCl 0,5 M, pH 8,2). Răcirea soluției de iodacetamidă în gheață se face numai pînă la temperatura la care substanța se menține în soluție. Amestecul se ține la gheață încă o oră și după aceea se dializează la rece față de apă distilată, cu schimbări repetate timp de 4—6 ore, și apoi, peste noapte, tot cu schimbări repetate, față de o soluție de acid acetic sau propionic N.

Izolarea lanțurilor. Preparatul de γG-globulină redus se fracționează pe gel de Sephadex G-75, G-100 sau G-200, echilibrat cu acid acetic N sau acid propionic N (fig. 67). Piscul principal *H* se obține destul de pur, în schimb piscul *L* este impurificat cu lanțul *H*. Pentru îndepărtarea impurităților se concentrează eluatul *L* și se recromatografiază. Fragmentele *H* și *L* pot fi apoi analizate prin electroforeză în gel de amidon, acrilamidă și agaroză (164) (123).

Electroforeza în gel de amidon se face de obicei prin utilizarea tehnicii verticale, întrebuințînd următoarele tampoane : uree 8 M — acid formic 0,05 M, pH 3,5 (33) ; uree 8 M — tampon glicină 0,035 M, pH 8,8 (17). După amestecare cu gelul, pH-ul oscilează între 7 și 8. Vasele de electrozi se umplu cu acid boric 0,3 M — hidroxid de sodiu 0,06 N, pH 8,2. Analiza durează 15—24 de ore la o diferență de potențial de 5 V/cm. Concentrația proteică a probelor analizate poate varia între 0,3 și 1,2 g %.

Electroforeza verticală în gel de acrilamină se efectuează la o concentrație de acrilamidă de 6,5% (g/v) în uree 8 M și tampon TRIS 0,05 M, pH 8,8.

Analiza electroforetică la pH-ul alcalin evidențiază o eterogenitate a ambelor lanțuri, mai marcată pentru lanțul L (17) (164) (123).

Precizări. Reducerea γG-globulinelor în soluții apoase neutre de 2-mercaptoetanol, după tehnica arătată mai sus, nu disociază complet lanțurile polipeptidice, astfel că în piscurile *H* și *L*, obținute prin filtrare prin gel de Sephadex, se găsesc produși de agregare formați din cîte 2 lanțuri *H*, respectiv 2 lanțuri *L*. Din această cauză, greutatea lor moleculară este un multiplu de doi al greutății moleculare a lanțurilor neagregate, adică 110 000, respectiv 40 000. Lanțul *H* are o tendință de agregare mai mare decît lanțul *L* ; în acest fel se explică apariția fracțiunilor H_1 și H_2 (fig. 67) la filtrarea prin gel de Sephadex G-200. Probabil că piscul H_1 este un produs de agregare dintre lanțurile *H* și *L*.

În locul mercaptoetanolului pot fi folosiți cu același succes și mercaptoetilamina HCl, tioglicolatul de sodiu sau acidul tioglicolic și agenții de sulfonare a legăturilor disulfidice (46).

Tratarea cu mercaptoetanol a serurilor imune permite diferențierea anticorpilor γG de anticorpii γM. Ultimii, dacă sînt reduși, își pierd capacitatea de a reacționa cu antigenul

Scanned with OKEN Scanner

într-o manieră observabilă (precipitare), în timp ce activitatea anticorpilor γG nu este afectată. Se procedează astfel (118) : la o cantitate dată de antiser se adaugă atît mercaptoetanol cît să se realizeze o concentrație de 0,1 M. Se lasă două ore la temperatura camerei și se dializează cîteva ore față de o soluție de clorură de sodiu 0,15 M, tamponată la pH 8,0. Dacă după tratament antiserul nu mai are capacitatea de a precipita antigenul corespondent, anticorpii sînt de tip γM.

Bibliografie

1. Amiraian K. a. Leikhim E. J., J. Immunol., 1961, **87**, 301.
2. Arsenis C. a. Mc Cormick D. B., J. Biol. Chem., 1964, **239**, 3093.
3. Augustin R. a. Hayward B. J., Nature, 1960, **187**, 129.
4. Banovitz J., Singer S. J. a. Wolfe H. R., J. Immunol., 1959, **82**, 481.
5. Basset E., Beisser S. M. a. Tanenbaum S. W., Science, 1961, **133**, 1475.
6. Bennett J. C. a. Haber E., J. Biol. Chem., 1963, **238**, 1362.
7. Bernfeld P. a. Wan J., Science, 1963, **142**, 678.
8. Boettcher E. W., Kistler P. a. Nitschmenn H., Nature, 1958, **181**, 490.
9. Böszörmenyi I., Nature, 1958, **181**, 1 344.
10. Brandenberg H., Rev. ferm. ind. alim., 1956, **11**, 237.
11. Campbell D. H., Blaker R. H. a. Pardee A. B., J. Am. Chem. Soc., 1948, **70**, 2 946.
12. Campbell D. H. a. Lanni F., în Greenberg D. M., *Amino-acids and proteins*, C. Thomas, Springfield, 1951, 649.
13. Campbell D. H., Luescher E. a. Lerman L. S., Proc. Nat. Acad. Sci., 1951, **37**, 575.
14. Charlwood P. A., Biochem. J., 1959, **73**, 126.
15. Chow B. F. a Wu H., Science, 1936, **84**, 316.
16. Cohen S., Biochem., J., 1963, **89**, 334.
17. Cohen S. a. Porter R. R., Biochem. J., 1964, **90**, 278.
18. — Adv. Immunol., 1964, **4**, 287.
19. Corke K. B., Tombs M. P., Weston R. P., Souter F. a. Maclagan N. F., Clin. Chim., Acta, 1959, **4**, 774.
20. Crowle A. J., *Immunodiffusion*, Acad. Press, New York — Londra, 1961.
21. Crumpton M. J. a. Wilckinson J. R., Biochem. J., 1963, **88**, 228.
22. Curtain C. C., J. Histochem. Citochem., 1961, **9**, 484.
23. Davis B. D., Moore D. A., Kabat E. A. a. Harris A., J. Immunol., 1945, **50**, 1.
24. Delorme P., Richter M., Grant S. a. Rose B., Canad. J. Biochem., Physiol., 1962, **40**, 519.
25. Deutsch H. F., în *Methods in Medical Research* (editat de M. Cohn), Yearbook Publ., Chicago, 1955, V, 284.
26. Deutsch H. F., Gosting L. J., Alberty R. A. a. Williams J. W., J. Biol. Chem., 1946, **164**, 109.
27. Deutsch H. F., Thorpe N. O. a. Fudenberg H. H., Immunology, 1963, **6**, 539.
28. Dubert J. M., Slizewicz P. S., Rebeyrotte P. et Macheboeuf M., Ann. Inst. Pasteur, 1953, **84**, 270.
29. Dulong De Rosnay Ch. et Du Pasquier P., Ann. biol. clin., 1958, **16**, 363.
30. Edelman G. M., J. Am. Chem. Soc., 1959, **81**, 3 155.

Scanned with OKEN Scanner

REACŢIA ANTIGEN—ANTICORP

CAPITOLUL AL VIII-LEA. NOŢIUNI TEORETICE

REACŢIILE imunologice sînt bazate pe reacţia iniţială de combinare a antigenului cu anticorpul. Precipitarea, aglutinarea, citoliza sau alte reacţii imunologice complicate se petrec ulterior şi devin vizibile ca urmare a metodelor de evidenţiere aplicate. Aceste fenomene sînt manifestări vizibile *in vitro* ale aceloraşi anticorpi. Astfel, anticorpii antipolizaharid din pneumococ sînt capabili să precipite polizaharidul în mod specific (precipitine), să aglutineze pneumococii (aglutinine), să-i dizolve în prezenţa complementului (bacteriolizine) sau să-i facă susceptibili la fagocitoză (opsonine).

I. UNIREA ANTIGENULUI CU ANTICORPUL (14)

Cea mai simplă reacţie antigen-anticorp este considerată precipitarea unui antigen de către anticorpul omolog. Precipitatul este considerat în mod obişnuit ca o reţea tridimensională de molecule de antigen şi de anticorp, aşezate alternativ (7). Se presupune că antigenul este *polivalent*, adică conţine un număr cu atît mai mare de grupări determinante, cu cît suprafaţa lui (greutatea moleculară) este mai mare. Molecula de anticorp conţine două fragmente Fab unite printr-o legătură disulfidică pe care sînt fixate cîte o zonă de combinare. Deci anticorpii sînt din punct de vedere imunologic *bivalenţi*. Atunci cînd antigenul şi anticorpul vin în contact, grupările determinante şi zonele de combinare îşi pierd afinitatea pentru apă şi se atrag reciproc. Încărcarea electrică de acelaşi semn a antigenului şi a anticorpului (la pH alcalin majoritatea antigenelor şi toţi anticorpii sînt încărcaţi negativ) este neutralizată de electrolit şi se formează o reţea continuă tridimensională, care apare ca un precipitat vizibil (fig. 71).

Reacţia antigen-anticorp este o reacţie exotermă ; forţele implicate în legarea antigenului cu anticorpul sînt forţe van der Waals-London, care acţionează numai la distanţe mici, posibil, forţe electrostatice între sarcini de semn contrar şi legături de hidrogen.

Forţele van der Waals-London sînt slabe, 0,25 kcal/mol între moleculele de hidrogen şi 1,9 kcal/mol moleculele de azot şi oxigen. Atracţia columbiană dintre sarcinile opuse ale grupărilor ionice este de ordinul

Scanned with OKEN Scanner

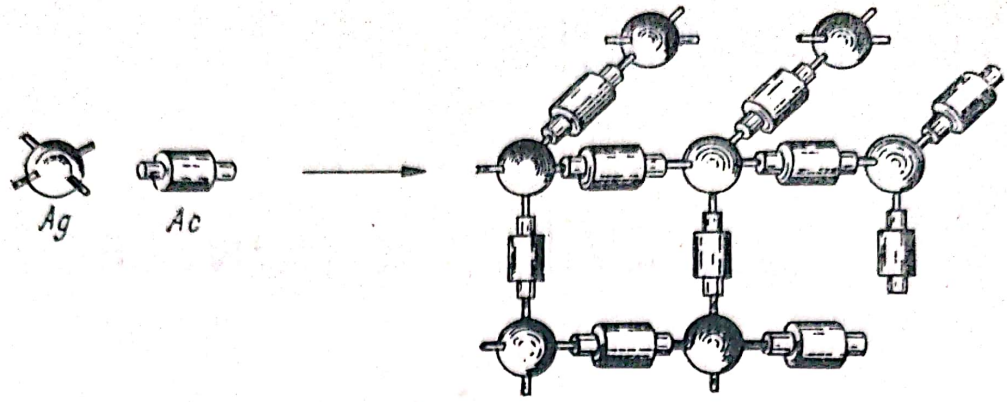


Fig. 71. — Combinarea antigenului cu anticorpul specific şi formarea reţelei tridimensionale.

4,5 kcal/mol şi se datoreşte faptului că zona de combinare a anticorpului este *replica electrică* a grupărilor ionice care alcătuiesc grupările determinante ale antigenului. Printre radicalii încărcaţi electric, incriminaţi în reacţia de combinare a antigenelor şi a anticorpilor pot fi amintiţi acidul aspartic şi glutamic (grupările carboxilice), lizina şi arginina (grupările aminice) şi tirozina (gruparea oxidrilică) (20).

Legăturile de hidrogen se stabilesc între atomi de mărime mică, destul de depărtaţi unul de altul. O legătură de hidrogen se stabileşte cînd un hidrogen al unui grup oxidrilic formează o punte cu un atom electronegativ, de obicei oxigen sau azot. Forţa acestei legături nu depăşeşte 5 kcal/mol însă cei trei atomi implicaţi în legătură trebuie să fie aliniaţi şi distanţaţi la cel mult 2,7 Å.

Cum toate cele trei tipuri sînt slabe, o legătură stabilă între antigen şi anticorp se formează numai cînd există cîteva legături de acest fel. Datorită distanţei scurte la care acţionează aceste forţe este necesar ca atomii sau grupările active ale anticorpilor să fie strîns mulate pe grupările sau atomii complimentari ai antigenului.

Combinaţia anticorpului (Ac) cu antigenul (Ag) este considerată ca o reacţie bimoleculară :

$$Ac + Ag \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AcAg,$$

unde k_1 şi k_2 sînt constantele pentru cele două sensuri ale reacţiei. Din legea acţiunii maselor se poate scoate relaţia :

$$\frac{[AcAg]}{[Ac]\,[Ag]} = \frac{k_1}{k_2} = K,$$

unde termenii din paranteze reprezintă concentraţia reactanţilor şi a produsului de reacţie, iar K este *constanta de echilibru* sau *de asociaţie*.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea valorii lui K pentru diferite reacţii antigen-anticorp este importantă, deoarece cu ajutorul ei se pot calcula datele termodinamice care indică natura legăturii dintre cei doi componenţi (v. cap. IX/II/3).

II. CURBELE DE PRECIPITARE

Dacă un antiser se pune în contact cu antigenul corespondent, se observă că după un anumit interval de timp apare un precipitat. Complexul insolubil format poate fi măsurat aplicînd una din metodele cunoscute de dozare a substanţelor proteice. Efectuînd cîteva precipitări cu cantităţi crescînde de anticorpi, se poate trasa o curbă de precipitare a anticorpilor, înscriind pe ordonată cantitatea de precipitat imun format, iar pe abscisă cantitatea antigenului adăugat (fig. 72). Se constată că, dacă se măreşte cantitatea antigenului, cantitatea precipitatului imun creşte în mod corespunzător pînă la un anumit maxim şi apoi începe să scadă, ajungînd pentru o cantitate mare de antigen la zero.

Dacă în supernatantele rămase după centrifugarea precipitatelor specifice corespunzătoare diferitelor puncte de construire a curbelor se testează prezenţa anticorpilor şi a antigenului adăugat, se constată următoarele : în primele eprubete sînt prezenţi anticorpii (s-a adăugat o cantitate insuficientă de antigen), iar în ultimele eprubete sînt prezentate antigenele (s-a adăugat antigenul în exces). În una sau mai multe eprubete de la mijlocul seriei nu se pot evidenţia nici anticorpul şi nici antigenul. Pentru multe antiseruri tocmai în aceste eprubete se constată formarea cantităţii maxime de precipitat imun.

Datorită acestei comportări, reacţia de precipitare a anticorpilor cu antigenul corespunzător poate fi împărţită în trei zone : zona excesului de anticorpi, zona de echivalenţă şi zona excesului de antigen. Pentru

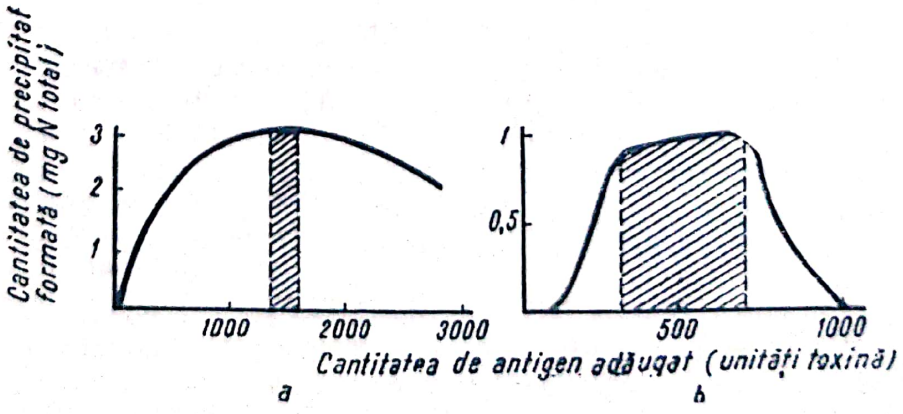


Fig. 72. — Curbă de precipitare a antigenului cu anticorpul. a, Curbă de precipitare pentru antiserurile de iepure; b, curbă de precipitare pentru antiserul de cal.

majoritatea sistemelor imune precipitante, zona excesului de antigen se confundă cu zona de inhibiție, în care nu are loc fenomenul de precipitare. Inhibiția precipitării se datorește cantităților insuficiente de anticorpi care formează complexe solubile cu antigenul în exces.

Pentru antiserul de iepure, ca și pentru majoritatea antiserurilor, curbele de precipitare prezintă un maxim rotunjit, indiferent de natura chimică a antigenului (fig. 72,*a*). Complexul imun format se dizolvă mai mult sau mai puțin rapid într-un exces de antigene, dar este insolubil într-un exces de anticorpi. Acest tip de reacție este cunoscut sub numele de reacție tip precipitină sau tip iepure.

Antiserul de cal nu dă astfel de curbe de precipitare decît pentru antigenele polizaharidice. Antigenele proteice dau curbe care prezintă un platou (fig. 72,*b*), precipitatul imun fiind solubil atît în exces de antigene, cît și în exces de anticorpi. Acest fel de reacție este cunoscută sub numele de reacție tip floculare sau tip cal.

Zona de echivalență este mai largă pentru reacțiile de tip floculare decît pentru cele de tip precipitină. De asemenea, ea este mai largă pentru serurile obținute de la animale imunizate un timp mai îndelungat decît la serurile animalelor imunizate un timp mai scurt. Comportarea acestor seruri imune poate fi legată de o diferență în natura chimică a anticorpilor implicați în reacția imună. Anticorpii care dau o reacție de tip precipitină pot fi γG-globuline, în timp ce reacțiile de tip floculare pot avea loc datorită anticorpilor γM (21)(22).

III. COMPOZIȚIA PRECIPITATULUI IMUN

În zona de echivalență, precipitatul conține totalitatea antigenului adăugat și a anticorpilor prezenți în antiser. Procentul anticorpilor din precipitatul imun depinde de greutatea moleculară a antigenului corespunzător (tabelul nr. 27).

TABELUL NR. 27

Variația procentului de anticorpi în precipitatele imune în raport cu greutatea moleculară a antigenului (adaptat după W. C. Boyd, 1939 și M. Heidelberger și colab., 1935)

Antigenul	Greutatea moleculară	Cantitatea de anticorpi (% din masa precipitatului imun)
Polizaharid pneumococic III	4 000	98,5
Ovalbumina	42 000	90,6
Albumină serică	70 200	85,7
Hemocianina	3 000 000	60,4

Scanned with OKEN Scanner

Se observă că într-un precipitat imun obţinut la punctul de echivalenţă procentul anticorpilor este cu atît mai mic, cu cît greutatea moleculară a antigenului este mai mare. De aceea, cantitatea de precipitat imun măsurată la echivalenţă nu poate fi considerată egală cu concentraţia anticorpilor din antiser decît în prima aproximaţie şi numai pentru antigenul cu o greutate moleculară mai mică de 40 000. În ultimul caz se consideră, în mod convenţional, că anticorpii reprezintă 90% din N precipitatului imun dozat.

Compoziţia precipitatului imun variază şi în raport cu cantitatea de antigen adăugată antiserului. Procentul anticorpilor din precipitat scade treptat, pe măsură ce se trece din zona excesului de anticorpi în zona excesului de antigen.

Alături de antigen şi anticorp, precipitatul imun conţine întotdeauna şi o cantitate mică de complement, chiar dacă antiserul testat nu este proaspăt recoltat.

IV. FACTORI CARE INFLUENŢEAZĂ REACŢIA DE PRECIPITARE

Asupra reacţiei de precipitare îşi exercită influenţa o serie de factori care pot modifica mersul reacţiei într-un sens care afectează precizia dozării anticorpilor. Dintre aceştia, o atenţie sporită trebuie acordată electroliţilor, pH-ului, temperaturii, conţinutului în lipide, vechimii antiserului şi volumului final de reacţie.

Electroliţii. Concentraţia salină joacă un rol esenţial în reacţia de precipitare (16). În absenţa electroliţilor, complexul specific se formează, dar nu precipită (3). Viteza de precipitare este în funcţie de concentraţia în săruri, trecînd printr-o valoare optimă, cuprinsă între 0,05 şi 0,2M (0,05—1 g%) pentru clorura, bromura şi iodura de sodiu.

O comportare deosebită o au antiserurile obţinute de la păsări, care precipită cantitatea maximă de anticorpi în soluţii de clorură de sodiu de aproape 10 ori mai concentrate decît cea fiziologică (8g%) (4)(5).

Trebuie remarcat de asemenea, că un exces de electroliţi inhibă reacţia de precipitare, datorită disocierii complexului (12).

Solubilitatea precipitatului imun în soluţia salină fiziologică este scăzută. De aceea, prin spălarea precipitatului cu soluţie salină fiziologică se pierd numai cantităţi mici de anticorpi, de ordinul 0,05 mg N/ml soluţie salină. Această pierdere poate fi micşorată prin întrebuinţarea soluţiilor saline răcite la 4°C, care solubilizează precipitatul imun într-o cantitate mult mai mică. Din proteina solubilizată, cea mai mare parte este alcătuită din anticorpi.

pH-ul. Reacţia de precipitare are loc numai într-un interval de pH cuprins între 4,5 şi 9,5 ; în afara acestor limite, precipitatul se dizolvă formînd complexe solubile. Zona de pH, în care cantitatea de precipitat imun este aproximativ constantă, este cuprinsă între 6,6 şi 8,0 (10)(9).

Temperatura. Cu toate că creşterea temperaturii măreşte viteza de precipitare, ea nu influenţează decît în mică măsură cantitatea finală a

precipitatului format. Astfel, cantitatea de anticorpi precipitaţi din serurile imune de iepure la 0°C este numai cu puţin mai mare decît cea care precipită la 37°C (10)(11)(13). Anticorpii din antiserurile de cal precipită în cantităţi cu 13% mai mari la 0°C decît la 37°C, de aceea, la antiserurile de această provenienţă se impune o temperatură joasă de precipitare (8). Precipitarea anticorpilor de găină nu este influenţată de temperatură, cel puţin în limitele cuprinse între 0°C şi temperatura camerei (19).

Folosirea unei temperaturi joase de precipitare implică şi prelungirea duratei de precipitare, deoarece întreaga reacţie este în mod corespunzător mai scăzută. De aceea, la temperaturi scăzute, precipitarea completă a anticorpilor dintr-un antiser se termină în 24—48 de ore. Deoarece precipitatul format la temperaturi scăzute are tendinţa să se dizolve parţial prin aducerea amestecului chiar la temperatura camerei, se impune ca toate operaţiile de prelucrare (spălări, centrifugări) să se efectueze la temperatura precipitării.

Conţinutul în lipide. Anticorpii conţin o cantitate oarecare de lipide, chiar după o purificare înaintată. De aceea, lipidele se găsesc întotdeauna în precipitatul imun. Ele joacă un rol important în insolubilizarea agregatelor antigen-anticorp. Îndepărtînd lipidele dintr-un antiser de cal, printr-o tehnică care nu denaturează proteina, se abolește capacitatea acestora de a mai precipita antigenul corespondent (24).

Vechimea antiserului. Pentru a avea o imagine cît mai exactă asupra conţinutului de anticorpi a unui antiser, este necesar ca determinările să se efectueze imediat după recoltarea lui. Dacă acest lucru nu este posibil, atunci este obligatorie recoltarea lui sterilă şi păstrarea la o temperatură cît mai scăzută. Este recomandabilă chiar îngheţarea antiserului la —20°C. Vechimea serurilor imune influenţează nefavorabil conţinutul în anticorpi. Scăderea concentraţiei anticorpilor este cauzată fie de denaturarea lor sub acţinea unor factori accidentali (temperatură, microorganisme etc.), fie de modificările structurale care însoţesc întotdeauna γ-globulinele în timpul păstrării lor, chiar şi la temperaturi scăzute (23) (fig. 32).

Prin învechire, serurile imune se tulbură, ceea ce perturbă de asemenea dozarea anticorpilor. Lipsa clarităţii poate fi observată şi la antiserurile proaspăt recoltate. Această situaţie apare atunci cînd animalele donatoare n-au fost ţinute *à jeun* 24 de ore înainte de recoltare. Dacă antiserurile au o opalescenţă puternică (hiperlipemie), ele pot fi clarificate printr-o centrifugare la rece timp de cîteva ore, la mare turaţie (aproximativ 10 000g).

Volumul final de reacţie. La antiserul de iepure, cantitatea de precipitat imun formată depinde nu numai de concentraţia antigenului şi a anticorpului, ci şi de volumul final de reacţie (15)(17)(18). Această comportare este determinată de solubilitatea relativ mare a precipitatelor imune de iepure în amestecul de reacţie (pînă la 10μg/ml). De aceea, pentru a reduce la minimum pierderile de precipitat imun, antiserul nu se diluează

Scanned with OKEN Scanner

(sau se diluează doar 1 : 1), iar cantitatea echivalentă de antigen se adaugă după dizolvarea ei într-un volum de soluţie cît mai mic posibil. Influenţa diluţiei antiserului asupra concentraţiei anticorpilor, măsurată prin tehnica micro-kjeldahl, este redată în tabelul nr. 28.

TABELUL NR. 28

Efectul diluării antiserului asupra cantităţii de precipitat imun ovalbumină-antiovalbumină de iepure (peste volume variabile de antiser s-au adăugat cantităţile echivalente de antigen şi apoi volumul final a fost ajustat la 3,0 ml) (adaptat după E. A. Kabat şi colab., 1961)

Volumul antiserului (ml)	Diluţia antiserului	Concentraţia anticorpilor (mg N/ml)	Eroarea (%)
1,50	1 :1	400	—
0,15	1 :20	273	31,6
0,0375	1 :80	166	58,3

La antiserurile de cal şi de om, datorită solubilităţii scăzute a precipitatelor specifice (aproximativ 1,5μg/ml), efectul volumului final de reacţie nu se face resimţit. De aceea, la măsurarea concentraţiei anticorpilor pot fi folosite şi antiseruri diluate (1)(6).

Bibliografie

1. Allen P. Z. a. Kabat E. A., J. Immunol., 1959, **82**, 358.
2. Boyd W. C. a. Hooker S. B., J. Gen. Physiol., 1939, **22**, 281.
3. Follensby E. M. a. Hooker S. B., J. Immunol., 1939, **37**, 767.
4. Goodman M. a. Wolfe H. R., J. Immunol., 1951, **66**, 285.
5. — J. Immunol., 1952, **69**, 423.
6. Goodman J. W. a. Kabat E. A., J. Immunol., 1960, **84**, 333.
7. Gray D. F., *Immunologie*, Edit. medicală, Bucureşti, 1966, 164.
8. Heidelbergr M. a. Kendall F. E., J. Exp. Med., 1935, **61**, 563.
9. — J. Exp. Med., 1935, **62**, 467.
10. — J. Exp. Med., 1935, **62**, 697.
11. — J. Exp. Med., 1937, **65**, 647.
12. Heidelberger M., Kendall F. E. a. Teorell T., J. Exp. Med., 1936, **63**, 819.
13. Heidelberger M., Kendall F. E. a. Mayer M., J. Exp. Med., 1942, **75**, 35.
14. Hughes — Jones N. C., Brit. Med. Bull., 1963, **19**, 171.
15. Kabat E. A. a. Mayer M. M., *Experimental Immunochemistry*, Thomas, Springfield, 1961, 37—39.
16. Marrack J. R., Immunology, 1958, **1**, 251.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL IX-LEA IMUNOPRECIPITAREA (MĂSURAREA CONCENTRAŢIEI ANTICORPILOR)

METODELE de detectare şi determinare a anticorpilor se folosesc continuu în cursul hiperimunizării animalelor şi reprezintă singurul mijloc de control direct al evoluţiei acestui proces. Dozarea se realizează prin punerea în evidenţă şi apoi măsurarea reacţiei de combinare a anticorpilor cu antigenul sau antigenele corespunzătoare. Cantitatea complexului imun antigen—anticorp poate fi apreciată cantitativ prin diferite mijloace imunochimice şi serveşte apoi la exprimarea concentraţiei anticorpilor din antiserul analizat. Sînt folosite în acest scop reacţiile de precipitare, aglutinare, fixare de complement şi anafilaxie.

În analiza imunochimică curentă se aplică pentru determinarea concentraţiei anticorpilor în antiseruri mai ales de reacţia de precipitare. Această preferinţă se manifestă în ciuda faptului că metodele de dozare, bazate pe imunoprecipitare nu au sensibilitatea celorlalte metode imunologice (tabelul nr. 29).

Astfel, prin reacţia de precipitare nu pot fi determinate concentraţii de anticorpi mai mici de 2 μg N anticorpi/ml de antiser. Dar, în serurile hiperimune folosite în analiza imunochimică curentă, concentraţia anticorpilor este de sute sau chiar mii de ori mai mare. În sîngele iepurilor imunizaţi s-a găsit o concentraţie apreciabilă de anticorpi, cuprinsă între 2 000 şi 2 300 μg N anticorpi/ml antiser (3). De aceea, pentru dozarea lor nici nu este necesară aplicarea unei metode mai sensibile decît cele bazate pe reacţia de precipitare. În plus, metodele imunochimice de largă circulaţie (imunoelectroforeză, difuzia în gel, colorаţiile imunofluorescente) se realizează tot prin precipitarea antigenului solubil de către anticorpii specifici. Din acest motiv, un antiser în care nu pot fi detectaţi anticorpi precipitanţi nu poate fi folosit ca reactiv în analizele imunochimice amintite mai sus, chiar dacă prin celelalte procedee se determină o anumită cantitate de anticorpi.

Dozarea anticorpilor prin reacţia de precipitare se bazează pe precipitarea lor din antiseruri cu ajutorul unor cantităţi variabile de antigen.

După metoda de apreciere a intensităţii reacţiei de precipitare, concentraţia anticorpilor poate fi exprimată în unităţi de măsură relative sau absolute. Concentraţia relativă se determină cu ajutorul unor metode

Scanned with OKEN Scanner

semicantitative în care rezultatele obţinute trebuie întotdeauna comparate cu un antiser standard de concentraţie cunoscută. Metodele riguros cantitative permit exprimarea concentraţiei anticorpilor fie în μg N anticorp/ml de antiser, fie în μg anticorp/ml de antiser , primul fel de exprimare fiind în mod convenţional mai mult folosit.

TABELUL NR. 29

Cantitatea minimă de anticorpi care poate fi măsurată prin diferite metode imunologice (adaptat după I. R. Marack, 1963)

Metoda	Cantitatea minimă de anticorpi (N anticorp sau N anticorp/ml antiser)
Precipitare	
Testul inelului	3—5 μg
Metoda proporţiei optime	8 μg/ml
Metoda micro-Kjeldahl	20 μg
Metode colorimetrice	4 μg
Metode de imunodifuzie	2—18 μg/ml
Fixare pe imunosorbenţi	7—10 μg/ml
Aglutinare	
Bacterii *(Salmonella)*	0,02 μg/ml
Hemaglutinare	0,1—0,2 μg/ml
Hemaglutinare pasivă	0,005 μg/ml
Fixare de complement (iepure)	0,1 μg
Anafilaxie (iepure)	
Tehnica Schultz-Dale	1 μg/ml
Tehnica anafilaxiei cutanate pasive	0,003 μg

Metodele cantitative sînt însă mult mai laborioase decît cele semicantitative. De aceea este mai convenabil ca evoluţia concentraţiei anticorpilor în cursul hiperimunizării animalelor să se urmărească printr-o metodă rapidă, semicantitativă. După ce s-a constatat că nivelul anticorpilor a atins un maxim, antiserul se recoltează în întregime prin exsanguinizarea animalelor, determinîndu-se apoi concentraţia absolută a anticorpilor precipitanţi.

I. METODE SEMICANTITATIVE DE DOZARE A ANTICORPILOR (5) (14) (28)

1. Măsurarea titrului precipitant al antiserurilor prin metoda inelului

Principiul. Concentraţia anticorpilor într-un antiser se poate aprecia în modul cel mai simplu, diluînd progresiv antiserul respectiv şi stabilind pînă la ce limită de diluţie el mai este capabil să precipite o cantitate fixă

din antigenul corespondent. Această diluţie limită se numeşte *titrul antiserului*, şi se notează de obicei printr-un raport numeric care are cifra 1 la numărător (de ex. 1/10 000).

Titrurile obţinute prin diluarea antiserului sînt puternic influenţate de concentraţia antigenului folosit în reacţie. Utilizînd o cantitate fixă de antigen şi diluînd progresiv antiserul, proporţia anticorpilor faţă de antigen va varia, trecînd din zona unui exces mare de anticorpi pînă în zona excesului de antigene. Deoarece în ultima zonă reacţia de precipitare este inhibată, se întîmplă deseori ca diluţia limită observată să nu depindă de puterea antiserului, ci de cantitatea antigenului prezent.

Din acest motiv, în mod obişnuit se determină nu diluţia limită a antiserului, ci *diluţia limită a antigenului* care mai dă încă o reacţie cu antiserul nediluat. Această diluţie este denumită *titrul precipitant al antiserurilor* şi este folosită de majoritatea autorilor ca o măsură a puterii antiserurilor.

Metoda de măsurare. Titrurile precipitante ale antiserurilor se măsoară de obicei prin metoda inelului, însă oricare altă metodă de măsurare a intensităţii reacţiei de precipitare poate fi aplicată cu succes.

Metoda inelului se realizează prin aşezarea unui strat de antiser nediluat peste un volum determinat din soluţia antigenică. La interfaţa dintre antiser şi antigen apare o zonă albă, mai mult sau mai puţin subţire (uneori apar chiar două zone), asemănătoare cu un inel. Pentru a observa în condiţii bune apariţia inelului, atît antiserul, cît şi soluţia de antigen trebuie să fie perfect limpezi. Observarea apariţiei inelului se face, de obicei, pe un fond negru.

Modul de lucru. Se folosesc eprubete de hemoliză (75×10 mm) perfect curate şi transparente. În fiecare eprubetă se introduc 0,9 ml din diluţiile succesive de antigen (46).

Diluarea antigenului se realizează astfel: se introduce în fiecare eprubetă, cu excepţia primei, cîte 0,9 ml de soluţie salină fiziologică. Se adaugă apoi în prima şi în a doua eprubetă cîte 0,9 ml de soluţie antigen. Se amestecă conţinutul eprubetei a doua prin aspirări repetate cu pipeta şi apoi se scot 0,9 ml şi se trec în eprubeta a treia. Se amestecă din nou conţinutul eprubetei şi 0,9 ml din ea se trec în eprubeta a patra ş.a.m.d. Ultimii 0,9 ml, care se obţin din eprubeta ce conţine cea mai mare diluţie de antigen, se aruncă. Pentru întreaga serie de diluţie se poate folosi o singură pipetă de 1 ml. Prin procedeul menţionat se realizează o diluţie succesivă de 1 :2, 1 :4, 1 :8, 1 :16 etc., dacă antigenul folosit a fost nediluat, sau 1 :200, 1 :400, 1 :800, 1 :1600 etc., dacă soluţia iniţială de antigen a fost diluată în prealabil de 100 de ori. Se pot folosi şi sisteme de diluare în care scăderea concentraţiei este mai lentă, dar realizarea lor este mai laborioasă.

Peste eprubetele conţinînd antigenul diluat se adaugă 0,1 ml din antiserul de testat *nediluat* (46). Antiserul se lasă să se scurgă din pipetă încet, pe marginile eprubetei uşor înclinată, pentru ca el să se întindă pe suprafaţa soluţiei de antigen fără amestecare. După un interval de timp de 10—30 min, apar la interfaţa celor două soluţii inele de precipitare caracteristice (fig. 73).

Se consideră ca titru al serului imun ultima diluţie la care mai apare un inel alb cu contur net şi care prezintă stabilitate la o uşoară agitare. Reacţia de precipitare şi citirile se efectuează la temperatura camerei.

Scanned with OKEN Scanner

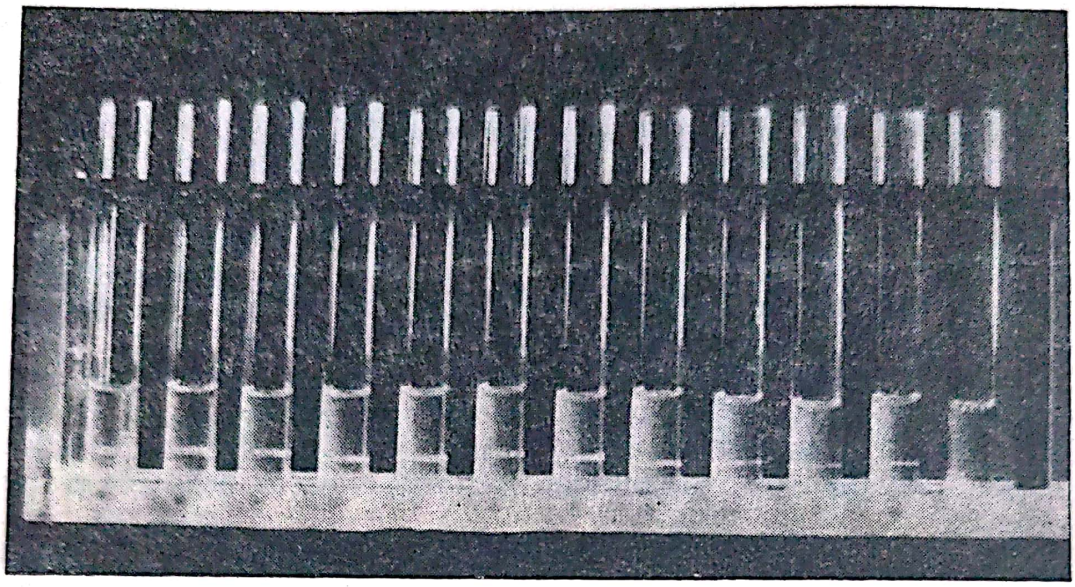


Fig. 73. — Stabilirea titrului unui antiser prin metoda inelului.

Alături de probele cu diluțiile de antigen se folosesc și doi martori : unul conține, în loc de antiser, serul unui animal neimunizat din aceeași specie ; celălalt are, în loc de antigen, o soluție salină fiziologică. Se poate verifica și specificitatea reacției, introducînd al treilea martor, o soluție dintr-un antigen cu o structură imunochimică înrudită.

Exprimarea rezultatelor. Exprimarea rezultatelor în titru permite compararea puterii precipitante a unor antiseruri preparate față de același antigen. Astfel, un antiser cu titru 1 : 100 000 va fi de două ori mai puternic decît altul cu titrul 1 : 50 000. Dacă pentru antiserul cu titrul 1 : 50 000 se determină concentrația absolută în anticorpi (250 μg N/ml) se poate presupune că antiserul cu titrul 1 : 100 000 va avea o cantitate dublă de anticorpi (500 μg N/ml).

Mărimea titrului unui antiser oarecare depinde atît de concentrația anticorpilor, cît și de concentrația inițială a antigenului, de intervalul de timp la care se face citirea și de temperatura folosită. De aceea, parametrii menționați trebuie păstrați constanți în cursul determinărilor și mărimea lor să fie consemnată în protocolul de lucru. Aplicînd testul inelului, volumul final al amestecului de reacție nu influențează titrul, nici chiar pentru anticorpii de iepure.

Pentru ca valorile titrurilor să se poată compara, este absolut necesar să se pornească întotdeauna de la aceeași concentrație a soluției de antigen. De aceea, este uneori util ca rezultatele să se exprime în „cea mai mică cantitate de antigen" care poate fi recunoscută de antiserul studiat. În acest fel, această valoare devine independentă de concentrația inițială a antigenului și se exprimă de obicei în μg/ml antigen. Calculul acestei

Scanned with OKEN Scanner

valori se face ușor, ținînd seama de concentrația inițială a antigenului și de diluția maximă la care se mai obține precipitare. Să presupunem că serul de iepure antiovalbumină este capabil să precipite antigenul corespondent pînă la o diluție de 1 : 64 000. Dacă soluția inițială de ovalbumină a fost de 10 000 μg/ml (1 g%) și dacă s-au introdus pentru testare 0,9 ml soluție de antigen, înseamnă că antiserul studiat poate recunoaște 1,4 μg antigen în 0,9 ml soluție (9 000 : 64 000), adică 1,55 μg/ml (1, 4/0,9).

Precizia metodei. Măsurarea titrului precipitant al antiserurilor are o precizie complet nesatisfăcătoare. De aceea, aplicarea ei în scopul determinării concentrației anticorpilor este legată de mari erori. Deoarece, în mod obișnuit, se fac diluții în progresie geometrică cu rația 2 a antigenului și deoarece este de multe ori dificil să se decidă în care din ultimele două eprubete se constată cea mai slabă reacție, precizia determinării titrului este în cel mai bun caz supusă unei erori de 100%.

Cu toate acestea, metoda continuă să fie larg întrebuințată, deoarece este sensibilă (tabelul nr. 29) și rapidă. Ea este recomandabilă în special la verificarea răspunsului imunologic al animalelor în cursul perioadei de hiperimunizare. Titrul precipitant măsurat prin această tehnică poate constitui un bun criteriu de selecționare a antiserurilor precipitante folosite în analiza imunochimică.

2. Determinarea raportului optim dintre antigen și anticorp prin metoda floculării (metoda Dean-Webb) (7)

Principiul. Metoda floculării se realizează prin adăugarea unei cantități fixe de antiser, la cantități variabile de antigen, notîndu-se apariția floculării în *funcție de timp*. Metoda se bazează pe faptul că viteza de floculare este o măsură a combinării antigenului cu anticorpul, deci și o măsură a concentrației unuia din reactanți (anticorpi). Flocularea apare mai repede sau mai încet, după raportul concentrațiilor existente între antigen și anticorp. Pentru un sistem imun dat, amestecul de antigen și anticorp în care apare cel mai repede fenomenul de floculare corespunde la un raport constant dintre diluția antigenului și cantitatea de antiser și a fost numit *punctul de proporție optimă* sau mai scurt *raportul optim* (*optimal ratio* în literatura anglo-saxonă). La acest punct întreaga cantitate de antigen este precipitată alături de cea mai mare parte, dacă nu chiar totalitatea, anticorpilor specifici.

Raportul optim de combinare a antigenului cu anticorpul se găsește în majoritatea cazurilor în interiorul zonei de echivalență sau în imediata sa vecinătate. Deoarece într-un sistem imun dat raportul optim este o constantă, indiferent de concentrația inițială a soluțiilor de antigen și de anticorp, el poate fi utilizat la evaluarea cu aproximație a concentrației anticorpilor în antiseruri.

Modul de lucru (2). Se folosesc eprubete de hemoliză perfect curate și transparente.

Diluarea antigenului se face obișnuit într-o progresie geometrică cu rația 1,5 și care se realizează astfel : într-o serie de eprubete de hemoliză se introduce o aceeași cantitate de

soluție salină fiziologică (de ex. 1 ml). În prima eprubetă se adaugă 2 ml din soluția de antigen de concentrație cunoscută, se amestecă prin aspirare într-o pipetă și se scot apoi 2 ml, care se adaugă în eprubeta următoare. Operația se repetă pînă la ultima eprubetă din care se aruncă 2 ml de amestec.

Antiserul se diluează înainte de folosire. Cel mai frecvent se întrebuințează diluțiile de 1/5 sau 1/10. Diluarea antiserului se face cu o soluție salină fiziologică, care nu influențează valoarea raportului optim ce urmează să fie determinată : în fiecare eprubetă se adaugă un volum de antiser diluat, egal cu cel al antigenului din eprubetă. Adăugarea se face cu cea mai mare repeziciune și apoi conținutul eprubetei se amestecă energic prin răsturnare de 2—3 ori.

În toate eprubetele se determină apoi timpul la care apare flocularea, fie la temperatura laboratorului, fie, pentru a accelera reacția, la 37°C. Eprubeta în care apare cel mai repede fenomenul de floculare conține raportul optim dintre cantitatea de antigen și de anticorp. Uneori, flocularea poate să apară în același timp în două eprubete alăturate. În acest caz, raportul optim este cuprins între valoarea celor două diluții.

Exprimarea rezultatelor. Rezultatele unor experiențe efectuate la diferite diluții ale antiserului sînt prezentate în tabelul nr. 30

TABELUL NR. 30

Timpul de precipitare, în min, al unor amestecuri de antigen și antiser omolog (după E. R. Gold, 1957)

Diluția antiserului	Diluția antigenului							
	1/50	1/100	1/200	1/300	1/400	1/600	1/800	1/1200
1/5	4	$3^1/_2$	$2^3/_4$	$3^1/_4$	$3^3/_4$	$5^1/_2$	7	10
1/10	$14^1/_2$	12	8	$6^1/_4$	6	$6^1/_2$	$8^1/_2$	11
1/20	134	39	30	25	19	$15^1/_2$	$13^1/_2$	16

Pentru a calcula raportul optim dintre antigen și anticorp, se împarte valoarea diluției antigenului la care flocularea apare cel mai rapid la diluția antiserului folosit. Se observă că, indiferent de diluția antiserului, raportul optim pentru sistemul imun studiat este 40 $\left(\frac{200}{5} = \frac{400}{10} = \frac{800}{20}\right)$.

Cunoscînd concentrația anticorpului în soluția inițială nediluată, se poate calcula cîte mg de anticorp reacționează, în raport optim cu 1 ml de antiser testat. Dacă în cazul de mai sus s-a pornit de la o soluție de antigen care conține 1 mg/ml de proteină, se poate calcula ușor că 1 ml de antiser reacționează, în raport optim, cu 1/40 = 0,025 mg de antigen. Această cantitate de antigen este precipitată în întregime împreună cu toată sau aproape toată cantitatea de anticorpi a antiserului. Dacă se consideră că anticorpii reprezintă 90% din întregul precipitat imun (vezi p. 274), se poate calcula că antiserul testat are o concentrație aproximativă în a corpi de 0,025 x 9 = 0,225 mg/ml (225 μg/ml).

Scanned with OKEN Scanner

Concentraţia anticorpilor poate fi apreciată mai exact folosind un antiser standard la care se determină atît *raportul optim*, cît şi *concentraţia absolută a anticorpilor*. Comparînd valorile raportului optim găsite pentru diferite antiseruri cu aceea a antiserului standard, se poate calcula simplu concentraţia absolută a anticorpilor. Bineînţeles, în toate aceste cazuri, antiserurile testate trebuie să fie omologe cu antiserul standard.

Precizia metodei. Determinarea raportului optim se face cu o precizie scăzută, valorile determinate fiind afectate de erori însemnate. Cauza principală a erorilor o constituie, ca şi la măsurarea titrului, felul în care se realizează diluţia antigenului. La acest fapt se mai adaugă şi dificultatea pe care o prezintă stabilirea exactă a probei în care apare primul semn de floculare, apreciere care depinde în bună măsură de experimentator.

Din aceste motive, determinarea raportului optim şi calculele care decurg din această mărime pot fi folosite doar la măsurarea aproximativă a concentraţiei anticorpilor.

Viteza de floculare poate servi ca un criteriu pentru evaluarea aviditătii serurilor imune precipitante. Determinarea vitezei de floculare a antiserurilor este cu atît mai importantă, cu cît s-a observat de multe ori că antiserul cu aceeaşi concentraţie de anticorpi floculează la intervale de timp diferite. Antiserurile cu aviditate mare (timp de floculare mic) dau rezultate foarte bune în experienţele de imunodifuzie.

II. METODE CANTITATIVE DE DOZARE A ANTICORPILOR (5) (28)

1. Dozarea anticorpilor în precipitatul imun (metoda Heidelberger)

Principiul. Deoarece anticorpii nu diferă de celelalte proteine serice prin nici o proprietate fizică sau chimică caracteristică, ei nu pot fi dozaţi decît după o prealabilă separare. Separarea se realizează prin precipitarea lor cu o cantitate echivalentă din antigenul corespondent. Precipitatul imun conţine totalitatea anticorpilor din antiser plus cantitatea de antigen folosită pentru precipitare. Scăzînd din cantitatea totală de azot partea care revine antigenului (dacă acesta conţine azot) şi raportînd valoarea găsită la 1 ml antiser, se obţine concentraţia anticorpilor în serul imun analizat.

La baza acestei tehnici stau următoarele constatări: reacţia de precipitare antigen-anticorp are o înaltă specificitate; în complexul imun nu sînt antrenaţi compuşi nespecifici (afară de o mică cantitate de lipide); precipitantul specific este foarte puţin solubil în soluţia salină fiziologică la temperaturi scăzute; reacţia de precipitare este cantitativă; determinările sînt reproductibile.

Tehnica dozării cantitative a anticorpilor a fost elaborată de M. Heidelberger şi F. E. Kendall (22) şi perfecţionată ulterior

de M. Heidelberger și C. F. Mac Pherson (23), precum și de alții (16).

Determinarea cantității optime de antigen. Pentru a precipita integral anticorpii din antiser, trebuie adăugată o cantitate de antigen care depășește cu foarte puțin zona de echivalență, realizîndu-se un ușor exces de antigen.

Această cantitate se determină prin experiențe preliminare. Se procedează astfel : la o cantitate fixă de antiser (de ex. 0,5 ml) se adaugă cantități succesive de antigen, dizolvate în volume foarte mici (0,02 ml). Precipitatul format se îndepărtează după fiecare adăugare. Operația se continuă pînă cînd nu se mai obține nici un precipitat. Cantitatea totală de antigen care s-a folosit pentru precipitarea succesivă reprezintă cantitatea echivalentă de antigen care se va folosi la dozarea anticorpilor. Din cauza fenomenului Danysz (vezi p. 253) este necesar ca la adăugarea antigenului într-o singură porțiune să se folosească o cantitate puțin mai mare decît cea care rezultă din însumarea porțiunilor succesive. La calcularea cantității de antigen care se adaugă antiserului analizat, trebuie să se cuprindă și porțiunea care nu a mai dat precipitare. În acest fel se asigură un foarte mic exces de antigen.

Dacă experimentatorul dispune de cantități mai mari de antiser, este preferabil să se traseze curba de precipitare, folosind în acest scop o metodă rapidă, turbidimetrică (v. p. 233) (fig. 62). Din curba de precipitare se determină zona de echivalență, respectiv cantitatea optimă de antigen care trebuie adăugată pentru precipitarea întregii cantități de anticorpi și pentru asigurarea unui mic exces de antigen.

Dacă precipitarea anticorpilor este completă, în supernatantul rămas după îndepărtarea precipitatului imun nu trebuie să se evidențieze decît un mic exces de antigen.

Pentru determinarea excesului de antigen se introduce într-o eprubetă de hemoliză o cantitate oarecare de ser imun nediluat (0,5—1,0 ml) peste care se adaugă cu precauție un volum egal din supernatant. Fără a amesteca conținutul eprubetei se urmărește dacă se formează inelul de precipitare. Apariția lui dovedește prezența excesului de antigen.

Prezența anticorpilor în antiser după precipitare poate fi constatată printr-o experiență similară. Se introduce într-o eprubetă de hemoliză un volum oarecare de supernatant (0,5—1,0 ml) peste care se adaugă cu precauție un volum egal din soluția de antigen, adusă pînă la cea mai mare diluție capabilă să dea încă reacția de precipitare cu antiserul studiat. În cazul excesului de anticorp, se formează, după un anumit timp (uneori destul de lung), inelul caracteristic. Dacă în supernatant se constată prezența anticorpilor, este un semn că nu s-a determinat corect cantitatea optimă de antigen.

Tehnica de precipitare. Reacțiile de precipitare se fac de obicei în eprubete de centrifugă cu fundul rotund, perfect degresate. Capacitatea lor variază în raport cu volumul total de amestec însă de obicei se folosesc dimensiunile mici (10/80 mm) care permit spălarea precipitatelor imune fără pierderi. Pot fi folosite și micrometode, în care reacția de precipitare se desfășoară în eprubete minuscule (4/27 mm) (13).

Se distribuie în două eprubete cîte 1 ml antiser [1] și se adaugă apoi cantitatea echivalentă de antigen determinată prin experiențe prealabile. Cantitatea echivalentă de antigen trebuie să fie dizolvată într-un volum minim de soluție salină fiziologică (de 5—10 ori mai mic decît volumul antiserului) și de aceea trebuie adăugată cu o pipetă foarte exact gradată. Pe lîngă proba luată în dublu, trebuie folosiți și doi martori : antiser, la care s-a adăugat, în loc

[1] Se pot folosi și cantități mai mici, ajungînd pentru ultramicrometode pînă la 10 µl (13).

Scanned with OKEN Scanner

de antigen, volumul corespunzător de soluţie salină fiziologică, antigenul într-o diluţie egală celei ce se realizează în amestecul final de reacţie. Cu aceşti doi martori se urmăreşte dacă cei doi parteneri din reacţie precipită nespecific în cursul manipulării lor ulterioare. Dacă se constată acest lucru, valorile găsite pentru precipitatul imun trebuie corectate în mod corespunzător.

Dacă se trasează curbele de precipitare pentru sistemul imun studiat, atunci se vor folosi 5—10 probe de cîte 1 ml de antiser, la care se vor adăuga cantităţi din ce în ce mai mari de antigen. Volumul final al amestecului de reacţie trebuie să fie identic în toate probele, de aceea dacă cantităţile variabile de antigen sînt cuprinse în volume diferite, se va aduce întotdeauna amestecul la un volum constant, cu soluţie salină fiziologică. Antiserul de iepure se aduce la volum constant cu o cantitate de soluţie salină fiziologică care nu trebuie să depăşească volumul său iniţial. În caz contrar, se va doza o cantitate de anticorpi mai mică decît cea existentă în realitate.

Imediat după adăugarea antigenului se astupă eprubetele cu dopuri de cauciuc şi se amestecă minuţios conţinutul lor. Se lasă apoi în repaus, la temperatura camerei sau la 37°C, timp de 30—60 min şi apoi se introduc în frigider la 0—4°C, unde se ţin un timp variabil, în raport cu cantitatea de anticorpi prezenţi în antiser. Antiserurile cu o concentraţie mai mare de 200 μg N/ml precipită complet în 48 de ore, în timp ce precipitarea în antiserurile cu o concentraţie mai mică nu se induce decît într-o săptămînă. Este recomandabil ca în acest timp eprubetele să se agite ocazional, prin rotaţie, avînd grijă ca precipitatul să nu se întindă pe pereţi şi soluţia să nu facă spumă.

Dacă se determină curba de precipitare a sistemului imun, în zona excesului de antigen precipitarea completă a complexului imun poate dura un timp şi mai lung. De asemenea, în zona excesului de anticorpi, unde precipită doar o mică fracţiune din aceştia, trebuie folosită o cantitate mai mare de antiser, pentru a avea o cantitate de precipitat imun dozabilă.

Spălarea precipitatului imun. Se centrifughează probele la o temperatură puţin mai ridicată de 0°C, timp de 45—60 min, la 3 000—5 000 g. Supernatantele trebuie să fie perfect limpezi. În probele martor nu trebuie să existe nici o urmă de precipitat. Dacă totuşi se observă un precipitat, el se prelucrează în continuare ca şi proba propriu-zisă.

Se îndepărtează imediat prin decantare lichidul supernatant, avînd grijă ca temperatura eprubetelor să se menţină joasă. Pentru aceasta, în cursul spălării lor eprubetele se imersează într-o baie de gheaţă. După decantare se răstoarnă eprubetele cu gura în jos, pe o hîrtie de filtru, pentru a îndepărta complet lichidul şi apoi se şterge interiorul eprubetei cu hîrtie de filtru. Aceste operaţii se pot executa uşor, deoarece precipitatul specific nu se detaşează de pe fundul eprubetei. Totuşi, supernatantul decantat trebuie controlat cu o lupă puternică dacă nu conţine particule dislocate din precipitat. Dacă se observă prezenţa particulelor, supernatantul se recentrifughează la o turaţie mai ridicată. Uneori, precipitatele imune nu sînt compacte şi nu aderă strîns de fundul eprubetei. În aceste cazuri, decantarea se face cu multă grijă, prin sucţionare şi nu prin răsturnare.

Pentru a elimina componenţii proteici care rămîn înglobaţi în precipitat, acesta se spală de două ori cu o soluţie salină fiziologică răcită la aproape 0°C, folosind volume de 1—2 ml. Este important ca la spălarea tuturor probelor să se folosească acelaşi volum de soluţie, pentru a nu produce solubilizarea inegală a precipitatelor şi a altera astfel reproductibilitatea experienţelor sau aspectul curbelor de precipitare.

Spălarea se efectuează astfel : se introduc în eprubete 1—2 picături de soluţie salină fiziologică şi, folosind o baghetă foarte fină, se aduce precipitatul imun în suspensie. După aceea, se adaugă restul de soluţie pînă la volumul de spălare ales. Se amestecă cu grijă şi se lasă

Scanned with OKEN Scanner

suspensia în repaus 30 min într-o baie de gheață, scuturînd ocazional. Se centrifughează și se decantează supernatantul după procedeul indicat mai sus. Operația se repetă. Este recomandabil să se controleze dacă în cursul spălării nu are loc o antrenare a precipitatului.

Dozarea proteinelor. Precipitatul spălat se dizolvă într-o soluție cu o compoziție astfel aleasă, ca în ea să se poată executa direct dozarea proteinelor. Metodele de determinare au fost descrise în capitolul IV.

Pentru microkjeldahlizare precipitatul se suspendă în cîteva picături de apă distilată și apoi se dizolvă adăugînd o picătură dintr-o soluție de NaOH 0,4 N. Eprubetele se agită cu grijă pînă la dizolvarea completă a precipitatului. Pe pereții eprubetelor nu trebuie să rămînă nici cea mai mică urmă de precipitat. Se aduce apoi soluția pînă la volumul dorit (de ex. 10 ml) și se determină conținutul ei în azot. Cantitatea determinată se raportează apoi la volumul inițial de antiser.

Pentru metodele colorimetrice, precipitatul imun se dizolvă într-un volum convenabil ales de NaOH 0,1 N sau N (pentru metoda cu BSP).

Pentru măsurarea concentrației proteice prin absorbție în UV la 280 mμ este preferabil ca precipitatul să se dizolve într-o soluție de acid acetic 0,25 N, în acest mediu rezultatele fiind mai reproductibile.

Metodele colorimetrice și spectrofotometrice permit exprimarea concentrației de anticorpi în μg de proteină/ml de antiser. Pentru a converti valorile găsite în unități convenționale (μg N/ml) se împart aceste valori la coeficientul 6,25 sau se trasează curbele de etalonare în coordonate extincție — μg N proteic.

Cantitatea de precipitat specific care poate fi măsurată depinde de sensibilitatea metodei de determinare folosită. Se pot doza (37): 10—100 μg N/ml prin microkjeldahlizare și prin metoda Lowry, 5—100 μg N/ml prin măsurarea absorbției în UV la 280 mμ, 20—400 μg N/ml prin metoda biuretului și 1—20 μg N/ml prin metoda cu ninhidrină. Aceste date arată că pot fi dozate concentrații de anticorpi pînă la 10 μg N/ml de antiser. Cum, în serurile hiperimune, concentrația anticorpilor este de zeci și chiar de sute de ori mai mare, rezultă că precipitatul imun trebuie dizolvat într-un volum de soluție cu atît mai mare cu cît concentrația anticorpilor este mai mare.

Interpretarea rezultatelor. Cantitatea de azot care revine anticorpilor se calculează scăzînd din cantitatea totală de azot a precipitatului imun cantitatea de azot cuprinsă în antigenul adăugat la echivalență. Această operație este posibilă și nu introduce erori, deoarece în zona de echivalență întreaga cantitate de antigen adăugată este înglobată în precipitatul imun. Faptul că în supernatant există totuși un foarte mic exces de antigen, nu introduce erori semnificative în determinare. Cantitatea de azot care revine anticorpilor poate fi calculată, considerînd că precipitantul imun este alcătuit în procent de 90% din anticorpi (tabelul nr. 27).

Dacă nu se precipită tot antigenul adăugat (zona excesului de antigen), corecția se efectuează numai după determinarea cantității de antigen rămasă în exces. Scăzînd această mărime din cantitatea totală de antigen adăugată, se află cantitatea de antigen din precipitatul specific (22)(21). Aceste determinări nu se efectuează decît în cercetări speciale, care urmăresc determinarea comportării precipitatului imun în zona excesului de antigen. Pentru reacțiile imune practicate cu antigene polizaharidice sau

Scanned with OKEN Scanner

cu haptene poliozidice care nu cuprind azot, valoarea cantității de azot cuprins în anticorp se confundă cu aceea găsită la analiza precipitantului imun (27)(15).

Precizări. Complementul poate aduce o contribuție semnificativă la cantitatea de azot din precipitatul imun, mai ales dacă se folosesc antiseruri proaspăt recoltate. Măsurarea cantității de complement incorporată în preparatul imun nu este realizabilă practic, de aceea se preferă prevenirea fixării sale în precipitat.

Cel mai eficient și comod mijloc de prevenire a încorporării complementului este adăugarea sării de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA). Se realizează în amestecul final o concentrație de 0,005 M, care inhibă activitatea complementului prin complexarea activatorilor săi Ca^{++} și Mg^{++}. Concentrația folosită împiedică asocierea complementului în complexul imun, fără a influența însă reacția de precipitare (34)(12)(1).

Nu este recomandabilă inactivarea complementului prin încălzirea antiserului la 56°C, deoarece chiar în 30 min o cantitate însemnată de anticorpi precipitanți se poate transforma în anticorpi neprecipitanți (30). Determinarea anticorpilor în aceste seruri va conduce la rezultate false.

2. Dozarea anticorpilor prin fixare pe imunosorbenți (metoda Gurvici)

Principiul. Dacă la un volum determinat de antiser se adaugă o cantitate potrivită de imunosorbent de care este legat antigenul corespondent, acesta fixează cantitatea de anticorpi din antiserul respectiv. Celelalte proteine ale serului se îndepărtează din imunosorbent prin spălare. Datorită acestui fapt, se poate determina cantitatea absorbită de anticorpi din antiser după creșterea cantității de proteine pe imunosorbent.

Utilizarea imunosorbenților pentru determinarea conținutului absolut în anticorpi a fost propusă și perfecționată de A. E. Gurvici (17)(20). Metoda a fost folosită apoi, atît de autorul ei (18)(38)(19), cît și de alții (32)(45), la determinarea cantității unei serii de anticorpi.

Alegerea imunosorbentului. Pentru determinările cantitative se pot folosi atît p-aminobenzoilceluloza (PAB-celuloza), cît și m-aminobenziloximetilceluloza (MABOM-celuloza). Prepararea, ca și legarea chimică a antigenului în molecula lor a fost descrisă în capitolul precedent și la anexa nr. IV.

Imunosorbenții folosiți trebuie să aibă o capacitate mare de fixare a anticorpilor pentru a putea fi utilizați în mod eficient la dozarea concentrațiilor ridicate de anticorpi. Dacă se adaugă la imunosorbent cantități crescînde de ser imun, creșterea cantității de anticorpi fixați pe imunosorbent este la început proporțională cu cantitatea de ser adăugată. Apoi, această proporționalitate începe să fie încălcată. Determinarea conținutului în anticorpi este posibilă numai în zona în care se menține proporționalitatea. Mărimea acestei zone depinde de capacitatea imunosorbentului, adică de cantitatea maximă de anticorpi capabili să se adiționeze

Scanned with OKEN Scanner

pe unitatea lui de greutate. Imunosorbentul m-aminobenziloximetil-celuloza adiţionează 330 mg de anticorpi/g şi are o zonă largă de proporţionalitate. Astfel, 10—12 mg de imunosorbent fixează proporţional pînă la 2 mg de anticorpi.

Modul de lucru. În două eprubete de centrifugă se introduc 0,5 ml de suspensie de conjugat antigen-imunosorbent în soluţie salină fiziologică. Suspensia trebuie să conţină între 5 şi 10 mg de imunosorbent. Peste această suspensie se adaugă 1 ml ser imun nediluat sau diluat de cîteva ori cu o soluţie salină fiziologică. Se diluează numai antiserurile care au un conţinut atît de ridicat în anticorpi, încît există pericolul ca cele 5—10 mg de imunosorbent să nu fie suficiente pentru fixarea întregii cantităţi de anticorpi. Se fac două probe martor: într-una din ele, în locul serului imun, se adaugă aceeaşi cantitate din serul unui animal neimunizat, iar în cealaltă se adaugă la imunosorbent numai soluţie salină fiziologică. Amestecul de antiser şi imunosorbent, ca şi probele martor se agită o oră la temperatura camerei. Se separă apoi complexul anticorp-imunosorbent prin centrifugare la temperatura camerei, 30 min la 5 000 g. Supernatantul trebuie să fie perfect limpede şi nu trebuie să conţină anticorpi.

Spălarea complexului anticorpi-imunosorbent se face de 2—3 ori cu o soluţie salină fiziologică tamponată la pH 7,0. Fiecare spălare se efectuează cu 2—3 ml de soluţie şi durează 10—15 min. Ultima apă de spălare nu trebuie să conţină proteine. Aceleaşi operaţii trebuie efectuate şi cu probele martor. După decantarea ultimei ape de spălare, se adaugă la precipitat 2 ml dintr-o soluţie de NaOH N şi amestecul se agită o oră şi apoi se centrifughează din nou. În acest fel se disociază complexul imun şi anticorpii trec în supernatant. Se transferă supernatantele cantitativ în alte eprubete, se aduc la un volum fix şi se determină concentraţia proteică prin oricare din metodele colorimetrice recomandate la capitolul IV. Dacă mediul prea alcalin influenţează asupra determinărilor, el poate fi neutralizat cu HCl N.

Exprimarea rezultatelor. Valorile găsite pentru antiserul analizat trebuie corectate cu valorile martorilor. Astfel, chiar pentru martorul imunosorbent-soluţie salină fiziologică se va determina o anumită concentraţie proteică, deoarece soluţia de NaOH N solubilizează şi o anumită cantitate din antigenul legat chimic de celuloză. Valoarea găsită pentru martorul imunosorbent-ser din animal neimunizat arată cantitatea de proteine serice adsorbite nespecific de imunosorbent, plus cantitatea de antigen solubilizat de soluţia alcalină.

Un protocol experimental în care se arată cum se poate calcula conţinutul în anticorpi a unui antiser este redat în tabelul nr. 31.

TABELUL NR. 31

Protocol experimental (după A. E. Gurvici şi colab., 1962)

Cantitatea de imunosorbent (mg)	S-au adăugat (ml):			Cantitatea de proteine dozate	Absorbţia nespecifică	Concentraţia anticorpilor
	Soluţie salină fiziologică	Ser de iepure neimunizat	Ser de iepure imunizat			
4,8	1,0	—	—	90	—	—
4,8	—	1,0	—	111	21	—
4,8	—	—	1,0	1926	21	1825

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea metodei. Sensibilitatea metodei este 7—10 μg anticorpi/ml antiser, ceea ce, convertit în unităţi convenţionale, înseamnă 1,1—1,6 μg N/ml. Măsurătorile au o precizie de 4%.

Sensibilitatea metodei depinde în special de mărimea absorbţiei nespecifice şi de mărimea cantităţii de antigen ce se desprinde de pe imunosorbent în urma eluţiei cu NaOH N. Cu cît absorbţia nespecifică este mai mică pentru una şi aceeaşi capacitate a imunosorbentului, cu atît este mai mică şi eroarea determinării. Pentru imunosorbentul m-aminobenziloximetilceluloza, absorbţia nespecifică este mai mică de 1mg/g imunosorbent. Datorită acestui fapt, atunci cînd se iau 5—10 mg de imunosorbent, iar cantitatea de anticorpi determinaţi depăşeşte 10—50 μg/ml, eroarea datorită absorbţiei nespecifice este neglijabilă. Deoarece cantitatea de proteină absorbită nespecific creşte o dată cu mărimea cantităţii de imunosorbent, se preferă diluarea antiserurilor cu o concentraţie mare de anticorpi şi nu creşterea cantităţii de imunosorbent.

Faptul că o dată cu anticorpii se eluează şi o anumită cantitate de antigen, scade din sensibilitatea metodei. Această deficienţă s-ar putea evita folosind în locul soluţiei alcaline o soluţie tampon de citrat-fosfat 0,1 M, pH 2,2, care extrage total anticorpii fără a desprinde însă antigenele (20).

Dozarea anticorpilor neprecipitanţi (41). În serurile imune există o anumită cantitate de anticorpi care nu precipită prin adăugarea antigenului. Ei se găsesc mai ales în sîngele animalelor, în prima fază a imunizării. Caracterul lor deosebit s-a pus pe seama univalenţei lor (44), pe seama locurilor de combinare mai mici şi mai neadaptate la grupările determinante ale antigenului (26) sau pe seama existenţei unor alte grupări chimice diferite de cele care alcătuiesc locurile lor de combinare (40).

Determinarea lor cantitativă nu se poate face prin metoda Heidelberger, ci numai prin metode speciale care folosesc coprecipitarea lor (24) sau tehnica marcării antigenului cu izotopi radioactivi (4).

Metoda fixării anticorpilor pe imunosorbenţi permite determinarea conţinutului antiserurilor în orice anticorp, inclusiv cei neprecipitanţi (17) (20). Confirmarea posibilităţilor de dozare a anticorpilor neprecipitanţi prin această metodă s-a făcut prin dozarea anticorpilor dintr-un ser imun de iepure antialbumină de om înainte şi după încălzirea antiserului timp de 20 min la 75°C. Rezultatele sînt prezentate în tabelul nr. 32.

TABELUL NR. 32

Determinarea conţinutului în anticorpi neprecipitanţi cu ajutorul imunosorbentului m-aminobenziloximetilceluloză conjugat cu albumină serică de om

Conţinutul în anticorpi înainte de încălzire (mg)		Conţinutul în anticorpi după încălzire (mg)	
M. Heidelberger	M. Gurvici	M. Heidelberger	M. Gurvici
1,63	1,55	0,12	1,53
2,3	2,4	0,1	1,2

Scanned with OKEN Scanner

Prin încălzire anticorpii îşi pierd aproape total capacitatea de a precipita, însă ei continuă să reacţioneze cu imunosorbentul. Această comportare arată că folosirea imunosorbenţilor la determinarea cantităţii absolute de anticorpi neprecipitanţi oferă posibilităţi mari pentru studiul lor prin intermediul unei tehnici realtiv simple.

3. Echilibrul de dializă

Reacţia de precipitare a unui conjugat proteină-haptenă cu antiserul său specific poate fi inhibată prin adăugarea prealabilă a haptenei singure sau a unui derivat cu o structură chimică inrudită. Această reacţie a primit numele de reacţie de inhibiţie a lui Landsteiner (33).

Ulterior, s-a observat că produşii de hidroliză parţială a polizaharidului pneumococic tip III sînt şi ei capabili să inhibe reacţia de precipitare dintre polizaharidul intact şi antiserul omolog (25)(35). De asemenea, reacţia de precipitare poate fi inhibată cu ajutorul fragmentelor Fab, obţinute prin hidroliza anticorpilor omologi (43)(11).

Reacţia de inhibiţie este determinată probabil de formarea complexelor solubile dintre anticorpi şi haptenele simple neprecipitante. Lipsa precipitării este determinată de mărimea redusă a complexelor formate, care păstrează o stabilitate suficient de mare.

Intensitatea recţiei de precipitare poate fi estimată efectuînd o serie de reacţii de precipitare cu cantităţi constante de antigene şi de anticorpi şi cu cantităţi variabile de haptenă. Cea mai mare diluţie a haptenei, care produce încă inhibarea reacţiei omologe, este considerată ca *titrul antiserului* (desigur, în raport cu haptena). Măsurarea directă, cantitativă a interacţiunii dintre haptenă şi anticorpi se realizează cu ajutorul echilibrului de dializă. Prin această tehnică se poate determina mărimea afinităţii pe care o au diferiţi anticorpi pentru haptenele corespondente şi se poate măsura gradul eterogenităţii lor. În plus, efectuînd determinările la două temperaturi diferite, se pot măsura şi schimburile de energie care au loc în cursul reacţiilor antigen-anticorp.

Teoria metodei. Haptena şi anticorpul se dizolvă într-un volum determinat (care poate fi egal) din acelaşi solvent şi se plasează apoi de o parte şi de alta a unei membrane de dializă (celofan). Echilibrul între haptena, cu greutate moleculară mică, şi locul de combinare al anticorpului omolog este reversibil şi poate fi reprezentat de ecuaţia :

$$\text{Haptenă} + \text{Anticorp} \rightleftharpoons \text{Haptenă} - \text{Anticorp},$$

în care se consideră că numai un singur loc de combinare a anticorpului este interesat în reacţie. Concentraţia totală a locurilor de combinare a anticorpilor este egală cu concentraţia moleculelor de anticorpi înmulţită cu valenţa lor.

Constanta de asociere K a haptenei cu anticorpii specifici se deduce din legea acţiunii maselor.

$$K = \frac{[\text{Haptenă} - \text{Anticorp}]}{[\text{Haptenă}]\ [\text{Anticorp}]}.$$

Dacă se consideră că toate locurile de combinare ale anticorpilor posedă aceeaşi constantă de asociere şi că combinarea anticorpului cu o moleculă de haptenă nu alterează apreciabil afinitatea sa pentru o altă moleculă, din ecuaţia de mai sus se poate deduce relaţia (31):

$$\frac{r}{c} = nK - rK \qquad (1)$$

unde r = numărul moleculelor de haptenă legate de o moleculă de anticorp; c = concentraţia haptenei libere; n = valenţa anticorpilor.

Reprezentînd ecuaţia în coordonatele $\frac{r}{c}$ (ordonată) şi r (abscisă), se obţine o linie dreaptă. Ea intersectează linia absciselor $\left(\frac{r}{c} = 0\right)$ pentru valoarea $r = n$. Se observă că în acest caz, valenţa anticorpilor reprezintă tocmai numărul maxim de molecule de haptenă care sînt fixate de o moleculă de anticorp (fig. 74, *a*).

Ecuaţia de mai sus poate fi scrisă şi într-o altă formă, în care ea are aspectul unei izoterme de absorţie de tip Langmuir, şi anume:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{n}. \qquad (2)$$

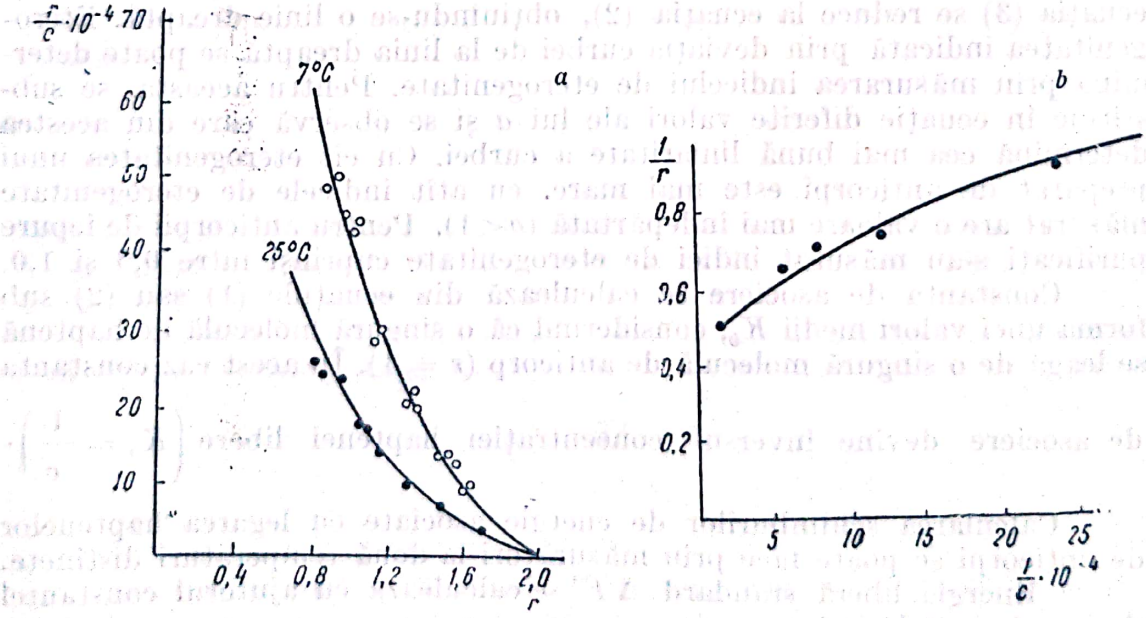


Fig. 74. — Legarea haptenelor de către anticorpii omologi purificaţi din serul de iepure (după F. Karush, 1956); a, Haptena = fenil-(p-azobenzoilamino)-acetat, coordonate = $\frac{r}{c}/r$; b, haptena = acid p-azobenzenarsonic, coordonate = $\frac{1}{r}, \frac{1}{c} \cdot 10^{-4}$; r = numărul moleculelor de haptenă legate; c = concentraţia haptenei libere.

Ecuaţia poate fi reprezentată în coordonatele $\frac{1}{r}$ (ordonată) şi $\frac{1}{c}$ (abscisă), în care caz se obţine de asemenea o linie dreaptă (fig. 74,*b*).

Pentru a afla punctul în care această dreaptă intersectează axa ordonatelor, se consideră concentraţia haptenei libere infinit de mare ($c \to \infty$; $\frac{1}{c} = 0$). În acest caz, punctul de intersecţie al ordonatei dă o valoare care este inversul valenţei anticorpilor $\left(\frac{1}{n}\right)$ (vezi ecuaţia (2)).

În realitate, aşa cum se observă din figurile 74a şi 74b, prin măsurarea interacţiunii dintre anticorpi şi haptenă se obţin valori care nu se aşază pe o linie dreaptă, aşa cum ar rezulta din ecuaţiile (1) şi (2), ci pe o curbă. Mărimea devierii curbelor de la liniaritate poate fi evaluată cantitativ, ea reprezentînd o măsură a eterogenităţii anticorpilor analizaţi. Calculul se bazează pe presupunerea că eterogenitatea constantelor de asociere poate fi reprezentată şi aproximată printr-o distribuţie a erorilor de tip Gauss (29). Ecuaţia de legare a haptenei de anticorp se poate scrie, în acest caz, sub o nouă formă (10) (42) (39) :

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n(Kc)^a} + \frac{1}{n}, \qquad (3)$$

unde a = indicele de eterogenitate. Pentru anticorpi omogeni $a = 1$ şi ecuaţia (3) se reduce la ecuaţia (2), obţinîndu-se o linie dreaptă. Eterogenitatea indicată prin deviaţia curbei de la linia dreaptă se poate determina prin măsurarea indicelui de eterogenitate. Pentru aceasta, se substituie în ecuaţie diferite valori ale lui a şi se observă care din acestea determină cea mai bună liniaritate a curbei. Cu cît eterogenitatea unui preparat de anticorpi este mai mare, cu atît indicele de eterogenitate măsurat are o valoare mai îndepărtată ($a<1$). Pentru anticorpii de iepure purificaţi s-au măsurat indici de eterogenitate cuprinşi între 0,5 şi 1,0.

Constanta de asociere se calculează din ecuaţiile (1) sau (2) sub forma unei valori medii K_0, considerînd că o singură moleculă de haptenă se leagă de o singură moleculă de anticorp ($r = 1$). În acest caz constanta de asociere devine inversul concentraţiei haptenei libere $\left(K_0 = \frac{1}{c}\right)$.

Calcularea schimburilor de energie asociate cu legarea haptenelor de anticorpi se poate face prin măsurători la două temperaturi distincte.

Energia liberă standard ΔF^0 se calculează cu ajutorul constantei de asociere, folosind formula :

$$\Delta F^0 = -RT \ln K_0 \qquad (4)$$

unde R = constanta gazelor ; T = temperatura absolută.

Scanned with OKEN Scanner

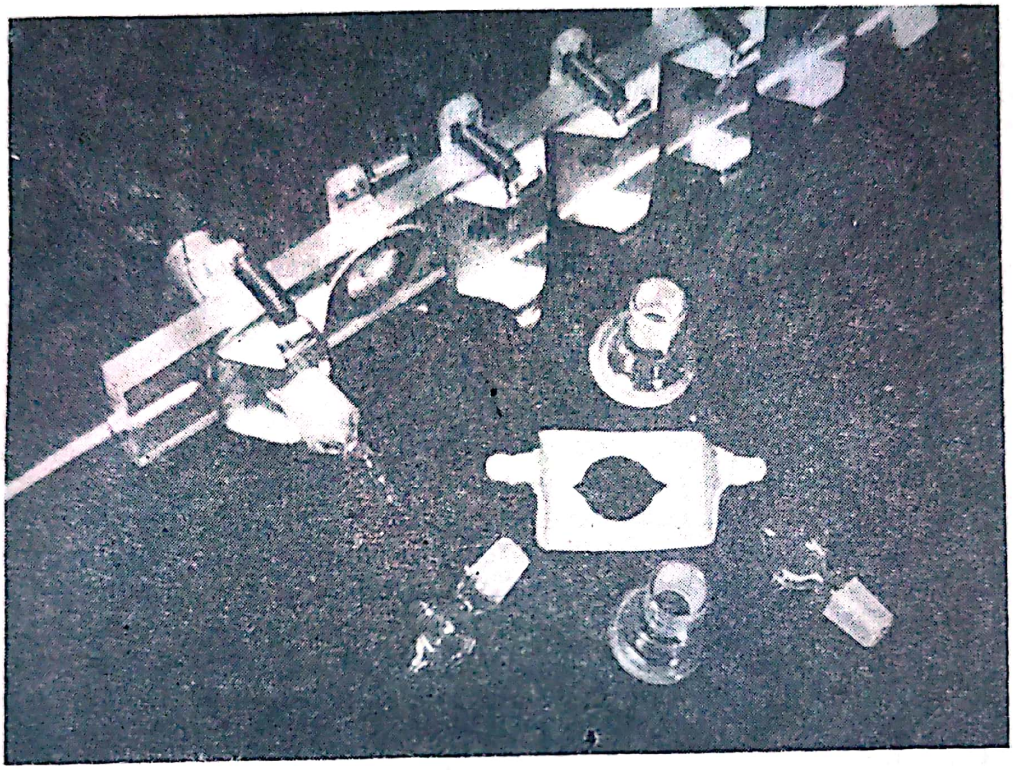


Fig. 75. — Celulă pentru echilibrul de dializă şi suportul pentru fixare în serie.

Energia liberă se măsoară în kcal/mol. Entalpia (ΔH°) poate fi calculată din ecuaţia :

$$\Delta H^\circ = 2{,}3R \log \frac{K_o^2}{K_o^1} \cdot \frac{T_2\ T_1}{T_2 - T_1}, \qquad (5)$$

unde K_o^2 şi K_o^1 = constantele de asociere pentru temperaturile absolute T_2 şi T_1, iar coeficientul 2,3 face trecerea de la logaritmii naturali la cei zecimali. Entalpia se măsoară tot în kcal/mol.

Cunoscînd mărimile energiei libere şi ale entalpiei, se calculează uşor entropia (ΔS^0) după formula :

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta F^\circ}{T} \qquad (6)$$

Entropia se exprimă în cal/grad.mol.

Instalaţia. Dializa de echilibru se poate efectua imersînd saci mici de celofan în care se introduce soluţia de anticorpi în eprubete etanş închise, umplute cu soluţia de haptenă (10)(39)(9).

Echilibrul de dializă este mai uşor de efectuat cu ajutorul unor celule speciale (fig. 75)(29)(9).

Scanned with OKEN Scanner

Celulele se construiesc din eprubete de sticlă Pirex, care se taie la o mărime ce depinde de volumul dorit de experimentator. La un capăt se închid cu dop de sticlă șlefuit iar celălalt se îndoaie cu marginea în afară pînă se formează un unghi de 90° cu pereții eprubetei (fig. 75). Capetele îndoite se rodează pînă se obține o suprafață cît mai uniformă. Membrana de celofan este introdusă între suprafețele rodate ale celor două celule de dializă. Celulele sînt atașate strîns una de cealaltă cu ajutorul unui inel de sîrmă sau de plastic. Celulele de dializă pot fi construite și din eprubete de cultură pentru celule.

Într-unul din compartimente se introduce soluția de anticorpi, iar în celălalt soluția de haptenă. Volumul compartimentelor depinde de cantitatea de anticorpi pe care experimentatorul o are la dispoziție. Se pot folosi celule cu o capacitate cuprinsă între 1 și 10 ml. Volumul celor două compartimente nu trebuie să fie neapărat egal, totuși acest lucru simplifică calculele. Secțiunea de contact a celor două celule variază între 1,5 și 2,5 cm, în funcție de volumul folosit. Înălțimea lichidului în celule nu trebuie să fie mult mai mare decît diametrul lor, pentru a nu prelungi prea mult durata dializei. Celulele se atașează de un suport metalic sau din material plastic și se introduc într-o baie de apă termostatată la temperatura dorită cu o precizie de 0,01°C. Suportul este mișcat continuu de un agitator. Poate fi folosită și o mișcare de rotație de 3—5 rot/min sau, mai eficientă, o mișcare de răsturnare continuă a celulelor.

Modul de lucru. Membrana de celofan se înmoaie timp de cîteva ore în apă distilată și apoi în soluția tampon folosită la analiză. Prin acest tratament se îndepărtează glicerina. Se taie apoi rondele de celofan și se montează etanș între cele două margini rodate ale celulelor. Pentru a avea siguranța unei perfecte etanșeități, se parafinează marginea suprafeței de contact.

Se introduc volume exact măsurate din soluția de anticorpi și de haptenă. Închiderea celulelor la partea lor superioară trebuie astfel realizată, încît în ambele compartimente să rămînă cîte o bulă mică de aer. Bula de aer servește la amestecarea lichidului în timpul rotirii celulelor. Capacul trebuie înșurubat etanș; eventual se parafinează pentru a împiedica pierderile de lichid în timpul echilibrării.

Haptena și anticorpul se dizolvă într-o soluție de NaCl 0,15 M, tamponată la pH 7,4 cu 0,01—0,02 M tampon-fosfat pentru a reduce efectul Donnan. Pentru a preveni dezvoltarea microorganismelor în timpul echilibrării, se adaugă soluțiilor streptomicină (200 μg/ml), care nu influențează legarea haptenei (8) (6).

Concentrația anticorpilor se menține fixă în toate celulele de echilibrare. De obicei, se folosesc valori de ordinul 10^{-5} M, ceea ce pentru anticorpii de iepure, care au o greutate moleculară de 156 000, înseamnă concentrații procentuale cuprinse între 0,15 și 1,5 g%. Concentrația haptenei se variază de la o celulă la alta, în limitele 10^{-6} — 10^{-5} M.

Celofanul poate absorbi o anumită cantitate de haptenă, de aceea, pentru fiecare serie de experiențe trebuie folosiți martori. Cantitatea absorbită se determină introducînd în ambele compartimente aceeași concentrație de haptenă. După atingerea echilibrului, se dozează cantitatea de haptenă rămasă în soluție. Diferența dintre cantitatea de haptenă introdusă inițial și

cea găsită experimental reprezintă absorbția celofanului. De obicei, aceasta variază în jur de 10% din cantitatea totală de haptenă.

Durata echilibrării se determină, de asemenea, cu probe martor. În unul din compartimente se introduce haptena, iar în celălalt numai soluția tamponată de clorură de sodiu. Timpul în care concentrația în ambele compartimente devine egală marchează durata experiențelor. De obicei, la 25°C echilibrarea se atinge în 24 de ore. Pentru temperaturi mai scăzute durata se poate dubla.

Deoarece toate experiențele se fac în duplicat, rezultă că pentru determinarea unei curbe de legare a haptenei cu anticorpii omologi sînt necesare 12—15 perechi de celule de dializă. Modul în care se montează o experiență este înfățișat în tabelul nr. 33.

TABELUL NR. 33

Protocol experimental (după F. Karush, 1956)

Celula de dializă (nr.)	Conținutul compartimentelor	
	1	2
1	$0{,}5.10^{-5}$M haptenă	$3{,}0.10^{-5}$M anticorp
2	$1{,}0.10^{-5}$M „	$3{,}0.10^{-5}$M „
3	$2{,}0.10^{-5}$M „	$3{,}0.10^{-5}$M „
4	$4{,}0.10^{-5}$M „	$3{,}0.10^{-5}$M „
5	$8{,}0.10^{-5}$M „	$3{,}0.10^{-5}$M „
6	$1{,}0.10^{-5}$M „	$1{,}0.10^{-5}$M haptenă
7	$4{,}0.10^{-5}$M „	soluția salină

După atingerea echilibrului se desfac celulele în cele două compartimente. Se dozează apoi haptena din compartimentul în care a fost introdusă inițial, prin metode adecvate. Sînt preferate, pentru rapiditatea lor, metodele spectrofotometrice. Tot în aceste compartimente se testează, cu acid sulfosalicilic, prezența anticorpilor, pentru a controla dacă membrana de celofan a fost impermeabilă pentru macromolecule. Dacă sînt prezente urme de proteină, experiența trebuie repetată.

Exprimarea rezultatelor (exemplu) (29). Dacă concentrația haptenei în celula de dializă nr. 4 a fost găsită, după atingerea echilibrului de dializă, egală cu $1{,}18.10^{-5}$ M, atunci concentrația haptenei libere în ambele compartimente este $2.1{,}18 = 2{,}36.10^{-5}$ M (deoarece volumele lor au fost egale). Dacă în determinările din celula nr. 6 s-a găsit că celofanul absoarbe 10% din haptena liberă, atunci cantitatea totală de haptenă nelegată este de $2{,}36 + 0{,}24 = 2{,}60.10^{-5}$ M. Scăzînd această valoare din concentrația inițială a haptenei (exact $3{,}96.10^{-5}$ M) se observă că este legată de anticorpi o concetrație de $1{,}36.10^{-5}$ M haptenă. Numărul de moli de haptenă legat de 1 mol de anticorpi (r) se calculează ușor din raportul 1,36/3,0 ca fiind egal cu 0,45.

După acest exemplu se calculează valoarea r pentru toate concentrațiile de haptenă folosite. Valorile calculate se introduc fie în sistemul

de coordonate $\frac{r}{c}$ (ordonată) și r (abscisă) și atunci se găsește o curbă de tipul celei reprezentate în figura 74*a*, fie în sistemul de coordonate $\frac{1}{r}$ (ordonată și $\frac{1}{c}$ (abscisă), în care caz se găsește o curbă asemănătoare celei din figura 74*b*.

După trasarea curbelor se calculează valența anticorpilor (cu o precizie de 5—10%), coeficientul de asociere K_o, indicele de eterogenitate și celelalte date termodinamice calculate după ecuațiile (3) (4) (5) și (6). În tabelul 34 sînt prezentate datele calculate cu ajutorul curbelor din figura 74 *a*.

TABELUL NR. 34

Date asupra legării fenil-(p-azobenzoilamino)-acetatului de către anticorpii de iepure omologi, purificați (după F. Karush, 1956)

Valența anticorpilor (n)	Indicele de eterogenitate (a)	25°C		7,1°C		ΔH^0	ΔS^0
		K_0	$-\Delta F^0$	K_0	$-\Delta F^0$		
2,0	0,7	$2{,}05.10^5$	7,25	$4{,}4.10^5$	7,24	7,1	0,3
2,0	0,7	$3{,}1.10^5$	7,50	$6{,}7.10^5$	7,48	7,3	0,7

Haptena folosită a fost fenil-(p-azobenzoilamino)-acetatul. Antiserurile au fost obținute prin injectarea iepurilor cu această haptenă cuplată cu γ-globulina de bou, iar anticorpii s-au obținut sub formă purificată (29).

Bibliografie

1. Aitken I. D. a. Muuigan W., Immunology, 1962, **5**, 295.
2. Boyd W. C., J. Exp. Med., 1941, **74**, 369.
3. Boyd W. C. a. Bernard H., J. Immunol., 1937, **33**, 111.
4. Burtin P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, **37**, 977.
5. Campbell D. H., Garvey J. S., Cremer N. E. a. Sussdorf D. H., *Methods in Immunology*, Benjamin Inc., New York — Amsterdam, 1964, 130—143.
6. Carsten M. E. a. Eisen H. N., J. Am. Chem. Soc., 1955, **77**, 1273.
7. Dean H. R. a. Webb R. A., J. Path. Bact., 1926, **29**, 473.
8. Dubert J. M., Ann. Inst. Pasteur, 1959, **97**, 679.
9. — *Thèse de Sciences*, Editions Chiron, Paris, 1959.
10. Eisen H. N. a. Karush F., J. Am. Chem. Soc., 1949, **71**, 363.
11. Fahey J. L., J. Immunol., 1963, **91**, 448.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL X-LEA. IMUNODIFUZIA ÎN GEL

CAPACITATEA anticorpilor de a precipita specific antigenul corespondent poate fi pusă în evidenţă nu numai prin amestecarea lor directă (v.cap. IX), ci şi lăsîndu-i să difuzeze într-un mediu gelificat. Difuzia se poate realiza în două feluri : *a*) anticorpul este prins în mediul gelificat şi antigenul este lăsat să difuzeze în acest mediu ; *b*) atît anticorpul, cît şi antigenul se introduc în două regiuni diferite ale gelului şi sînt lăsaţi să difuzeze unul spre celălalt.

Prima modalitate de a realiza imunodifuzia se numeşte *difuzie simplă* şi a fost introdusă în analiza imunochimică de O u d i n în 1946 (28). Ea aminteşte de testul inelului (v.cap.IX/I) : într-o eprubetă îngustă (de hemoliză) se introduce antiserul împreună cu cantitatea de agar-agar necesară pentru solidificarea mediului. Peste gel se adaugă un volum determinat din soluţia antigen. Concentraţia lui trebuie să fie mai mare decît a anticorpului, pentru ca antigenul să difuzeze în interiorul gelului. Se formează un număr de benzi de precipitare egal cu numărul minim de antigene distincte existente în amestecul analizat.

Difuzia anticorpului şi a antigenului, unul spre celălalt, constituie metoda de *dublă difuzie în gel* introdusă independent de O u c h t e r l o n y şi E l e k în 1948 (26)(27). Ea se poate realiza în trei variante principale : *a*) difuzia radială, în care antigenul şi anticorpul se introduc în două orificii aşezate la o anumită distanţă unul de celălalt (tehnica Ouchterlony) ; *b*) difuzia liniară la 90°, în care antigenul şi anticorpul se introduc în două şanţuri aşezate în formă de L (tehnica Elek) ; *c*) difuzia liniară la 180°, în care anticorpul şi antigenul, prinşi într-un mediu gelificat, sînt despărţiţi printr-o zonă de gel pur (tehnica Oakley-Fulthorpe-Peer) (23)(29).

Tehnica Ouchterlony şi Elek se efectuează în geluri întinse pe plăci de sticlă pe cînd tehnica Oakley se efectuează, ca şi tehnica Oudin în eprubete de hemoliză (fig. 76).

Metoda *difuziei simple* este mai puţin utilizată decît metoda *dublei difuzii* ; există prea puţine împrejurări experimentale în care folosirea difuziei simple se vădeşte a fi mai indicată. De aceea, în acest capitol ne-am oprit numai asupra dublei difuzii ca atare sau în legătură cu separarea electroforetică prealabilă a antigenelor (imunoelectroforeza).

Metoda imunoelectroforetică, elaborată în 1953 de G r a b a r (13)(15) se bazează pe separarea electroforetică prealabilă în gel de agar a componentelor dintr-un amestec antigenic complex şi apoi antiserul (anticorpul)

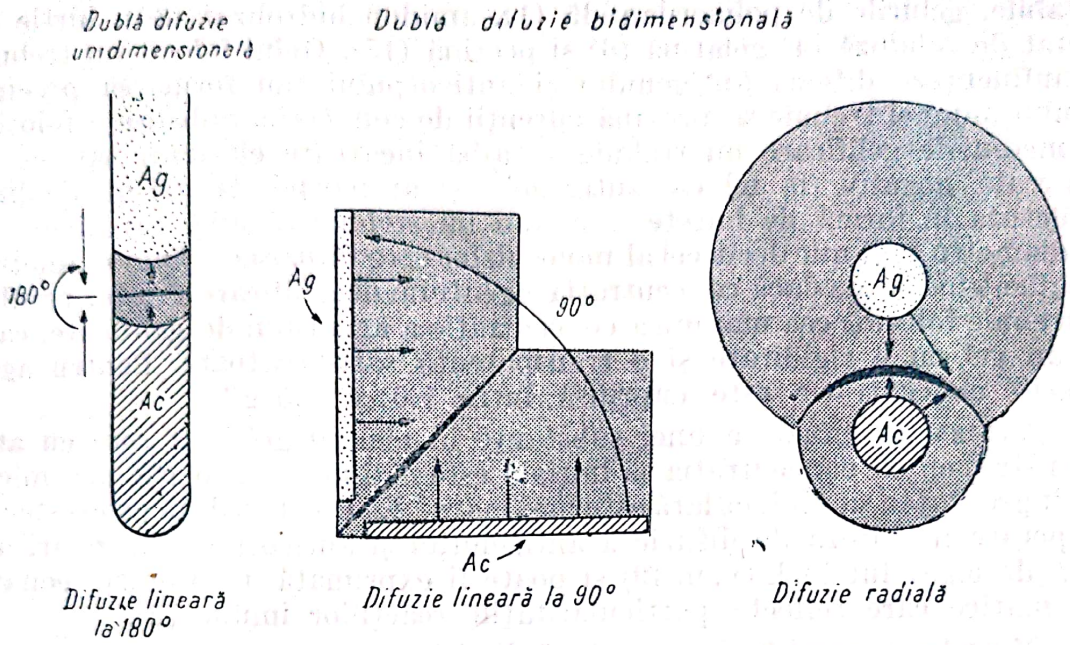


Fig. 76. — Schema principalelor tehnici de dublă difuziune (adaptată după A. J. Crowle, 1961).

este lăsat să difuzeze spre ele dintr-un şanţ paralel, tăiat în agar (fig. 77). Se formează linii (sau arcuri) de precipitare acolo unde se întîlneşte zona de difuziune a anticorpilor cu zonele de difuziune ale spoturilor de antigen, etalate de-a lungul plăcii de agar care a servit la electroforeză.

Mediul gelificat în care se efectuează cu predilecţie imunodifuzia este agarul (28)(13) sau agaroza[1] (3)(11). Se mai pot folosi, fără avantaje

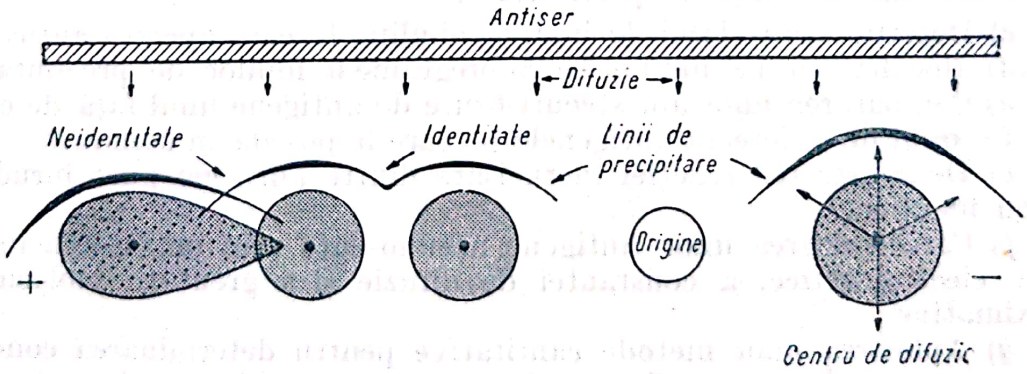


Fig. 77. — Formarea liniilor de precipitare la imunoelectroforeză (adaptată după A. J. Crowle, 1961).

[1] Agarul este un polizaharid acid, fiind format din două componente distincte : agaropectina şi agaroza. Agaroza este elementul principal, constituit din resturi de 3,6 anhidril — L galactoză şi D — galactoză, legate alternativ. Agaroza nu conţine grupări acide, de aceea este mediul ideal pentru imunodifuzie.

Scanned with OKEN Scanner

notabile, gelurile de poliacrilamidă (1), amidon hidrolizat (30), hîrtie de acetat de celuloză (4) gelatină (6) şi pectină (13). Gelul folosit nu trebuie să influenţeze difuzia antigenului şi anticorpului sau formarea precipitatului imun şi trebuie să prevină curenţii de convecţie. Substanţa folosită ca mediu de gelificare nu trebuie să aibă încărcare electrică sau să fie încărcată negativ (la fel ca antigenele şi anticorpii, la pH-ul alcalin). Structura în formă de burete a gelului nu trebuie să aibă canalicule cu un diametru mai mic decît cel al moleculelor care difuzează. Cum diametrul canaliculelor scade dacă concentraţia agentului de gelificare creşte, rezultă că trebuie folosită cea mai mică concentraţie a agentului de gelificare, care dă un gel cu o rigiditate şi o transparenţă satisfăcătoare. Pentru agar această concentraţie este cuprinsă între 1,0 şi 1,5 g%.

Viteza de difuzie a unei substanţe în mediul gelificat este cu atît mai mare, cu cît concentraţia sa iniţială este mai mare şi cu atît mai mică, cu cît greutatea sa moleculară este mai mare. Ea creşte o dată cu creşterea temperaturii. Viteza de difuzie a antigenului şi anticorpilor în geluri ascultă de legea lui Fick (v. p. 49) şi poate fi exprimată în diferite ecuaţii matematice care reflectă particularităţile reacţiilor imune (2).

Metoda imunodifuziei are două limitări : nu se poate aplica decît la analiza antigenelor solubile şi nu poate folosi decît anticorpi precipitanţi. Dacă aceste două condiţii sînt îndeplinite de sistemul antigen-anticorp ales de experimentator, el îl poate aplica în următoarele împrejurări :

a) Determinarea numărului de antigene prezente într-un amestec complex (numărarea liniilor de precipitare).

b) Compararea antiserurilor preparate faţă de amestecuri antigenice complexe. După scopul cercetării se pot alege, fie antiserurile cu cel mai mare număr de anticorpi (care dau cele mai multe linii de precipitare), fie antiserurile care reacţionează numai cu un grup de antigene (care dau un număr mic de linii de precipitare).

c) Determinarea clasei de imunoglobuline la care aparţin anticorpii studiaţi (localizarea pe imunoelectroforegrame a liniilor de precipitare).

d) Compararea unor amestecuri brute de antigene unul faţă de celălalt cu scopul de a detecta antigenele pe care le posedă în comun.

e) Demonstrarea reacţiei încrucişate dintre antigene pure înrudite, dar nu identice.

f) Caracterizarea unor antigene necunoscute prin măsurarea mobilităţii electroforetice, a constantei de difuzie şi a greutăţii moleculare aproximative.

g) Aplicarea unor metode cantitative pentru determinarea concentraţiei unei proteine date, aflate într-un amestec complex cu alte proteine. Se folosesc antiseruri monospecifice care posedă anticorpi numai faţă de proteina dată.

h) Controlul purificării unor preparate antigenice (proteine, polizaharide, acizi nucleici, enzime, hormoni protidici etc.). Se folosesc antiseruri preparate faţă de antigenul brut şi faţă de antigenul aflat într-o stare de înaltă puritate.

Scanned with OKEN Scanner

I. OPERAŢII GENERALE

Dubla difuzie după Ouchterlony şi imunoelectroforeza implică o serie de operaţii particulare, caracteristice fiecărei metode, alături de operaţii generale, care se efectuează într-o manieră asemănătoare, dacă nu chiar identică, pentru ambele metode. De aceea, în acest paragraf vor fi expuse acele operaţii, fundamentale sau auxiliare, care sînt comune atît dublei difuzii după Ouchterlony, cît şi imunoelectroforezei.

1. Prepararea gelului

Pentru prepararea gelului se folosesc agarul sau agaroza. Agarul se găseşte în comerţ în diferite grade de puritate. Există astăzi produşi (Difco Noble Agar sau Difco Purified Agar) care se găsesc într-o formă suficient de pură pentru a fi folosiţi ca atare în imunodifuzie, fără nici o operaţie preliminară de purificare. Trebuie avut doar grijă ca o serie de experienţe să se efectueze cu acelaşi fel de agar, iar la schimbarea lui să se facă experienţe comparative.

Gelul se prepară astfel : se cîntăreşte 1,0 — 1,5 g de agar (agaroză) şi se introduce într-un vas Erlenmeyer. Se adaugă 100 ml din solventul ales (apă distilată, soluţie salină fiziologică, soluţie tampon). Se introduce vasul într-o baie de apă, care se aduce la fierbere. După ce tot agarul s-a dizolvat (cca 30 min se adaugă 1 ml dintr-o soluţie 0,2 g% mertiolat de sodiu, preparată tot în solventul folosit pentru dizolvarea agarului. Dacă soluţia de agar nu este limpede sau are suspensii, ea poate fi trecută repede peste o pîlnie astupată cu puţină vată hidrofilă. Dacă nu este necesară întreaga cantitate de agar preparată, restul poate fi repartizat în cîteva vase mici, fiecare vas conţinînd o cantitate de gel necesară pentru un număr cunoscut de plăci. Se evită astfel încălzirea repetată a gelului care dăunează proprietăţilor sale mecanice.

Mertiolatul de sodiu (thiomersal) se adaugă pentru a preîntîmpina contaminarea plăcilor cu microorganisme în cursul imunodifuziei. Mertiolatul se întrebuinţează în concentraţii de 0,01 — 0,02 g%, în care nu interferează reacţiile de precipitare în gel. În locul mertiolatului mai pot fi întrebuinţate : azida de sodiu 0,02 g%, fenolul 0,1 g%, penicilina 1 000 U. I./ml şi streptomicina 500 U. I./ml.

Purificarea agarului

Dacă experimentatorul nu posedă un agar comercial suficient de pur pentru imunodifuzie, acesta poate fi eliberat de diferitele impurităţi — săruri minerale, oxizi şi produşi de hidroliză solubili — prin spălare. Se procedează astfel : se taie agarul în bucăţi mici (dacă este în fire) şi se introduce într-un sac dublu de tifon. Se leagă sacul la gură şi se fixează la un robinet, astfel ca apa să treacă prin toată masa agarului. Se lasă să curgă apă curentă timp de 24 de ore, apoi se introduce sacul într-un vas cu apă distilată. Se schimbă apa distilată cît mai des posibil ;

Scanned with OKEN Scanner

după circa 24 de ore nu se mai găsește clor în apa de spălare (testat cu $AgNO_3$). Se scoate agarul din sac, se dispersează în etanol 96° și se spală cu acest solvent de trei ori cîte 30 min. Se întinde în strat subțire pe o suprafață de sticlă și se usucă în etuvă la maximum 80°C.

Prepararea agarozei

Cantități mici de agaroză (5—10 g) pot fi obținute plecînd de la agar prin următorul procedeu rapid (12) : se încălzesc pe o sită la fierbere 200 ml dintr-o soluție 0,02 M de citrat de sodiu și se adaugă treptat, sub agitare continuă, 8 g de agar (Difco Noble Agar). Agitarea trebuie continuată pînă la dizolvarea completă a agarului ; în caz contrar, acesta se arde la fundul vasului și se degradează. Aparte se dizolvă 3 g de clorură de cetil-piridiniu în 100 ml soluție de citrat de sodiu 0,02 M, adusă la fierbere. Soluția fierbinte de cetil-piridiniu se adaugă încet, sub agitare, în soluția, de asemenea fierbinte, de agar. Apare o tulbureală datorită formării unei suspensii coloidale a complexului insolubil agaropectină — clorură de cetil-piridiniu. Amestecul se ține 30 min în etuvă la 65°C, după care se diluează cu un volum egal de soluție de citrat de sodiu 0,02 M încălzită la 65°C și se filtrează imediat. Diluarea micșorează viscozitatea soluției, fără a solubiliza complexul agaropectină — clorură de cetil-piridiniu.

Se montează o pîlnie Büchner cu un diametru de 20 cm, încălzită în prealabil în etuvă, la un vas de trompă a cărui parte inferioară se scufundă într-un vas cu apa menținută în tot timpul filtrării la 65°C. Se așază în pîlnie o hîrtie de filtru cu filtrare lentă și se toarnă repede o suspensie apoasă de oxid de aluminiu sau kiselgur, încălzită tot la 65°C. Se conectează imediat vasul la trompa de apă și se lasă să se depună un strat de material adsorbant. De obicei, volumul suspensiei se alege astfel ca stratul adsorbant să nu depășească 4 mm. Dacă granulația materialului adsorbant este mare, în vasul de trompă filtrează un lichid fără urme de material adsorbant. Cînd stratul de material adsorbant de la suprafața filtrului începe să se întărească, se adaugă amestecul de filtrat în 3 porțiuni de cîte 200 ml fiecare. În aceste condiții, stratul adsorbant din pîlnie se schimbă după fiecare 200 ml filtrați. În acest fel filtrarea fiecărei porțiuni durează circa 30 min. Pentru ca în acest timp amestecul să nu se gelifice, în pîlnie se introduce un vas Berzelius cu un diametru de 8—10 cm, umplut cu apă încălzită la 60—80°C.

Filtratul de agaroză se introduce repede într-un volum de 2—3 ori mai mare de etanol, agitînd energic. Se formează un precipitat alb, floconos, de agaroză. După depunerea lui se fac prin decantare încă două spălări cu etanol, timp de 30 min fiecare, cu agitare continuă. După decantarea ultimei porțiuni de etanol, se spală succesiv cu etanol absolut și cu eter etilic. Se îndepărtează eterul după decantare și precipitatul se usucă la aer. Se obțin 3—3,5 g agaroză

2. Montarea experiențelor

Plăcile de sticlă folosite pentru imunodifuzie se pot confecționa din plăci fotografice de pe care s-a îndepărtat emulsia sau din sticlă de geam de bună calitate. Ele trebuie să fie perfect degresate prin spălare cu detergent, apă curentă și apă distilată.

La un colț al plăcii, pe partea pe care se aplică gelul, se scrie cu un dermatograf numărul curent. Se așază placa pe o suprafață perfect orizontală și apoi se adaugă, cu o pipetă gradată, un volum determinat din soluția caldă de agar. În timpul curgerii agarului, pipeta se mișcă încet de-a lungul plăcii pentru a permite împrăștierea uniformă a soluției. Se

Scanned with OKEN Scanner

adaugă între 0,2 şi 0,3 ml/cm² de placă, ceea ce face ca gelul să aibă o grosime de 2 —3 mm.

Gelul de agar se poate aplica şi pe plăci de sticlă în prealabil acoperite cu un film uscat de agar. În acest scop, plăcile se imersează într-o soluţie de agar 0,2%, se scurge excesul, se şterge partea care nu va servi la depunerea gelului, şi se usucă la temperatura camerei. Se formează un film de agar care permite o mai bună aderenţă a gelului de agar.

După întărirea gelului (10—15 min) se taie orificiile sau şanţurile dorite. Tăierea lor se realizează cu ajutorul unor instrumente care sînt livrate de diferite firme producătoare de utilaj de laborator sau pot fi confecţionate de experimentator.

Orificii rotunde de diferite dimensiuni pot fi tăiate cu ajutorul unor perforatoare de dopuri bine ascuţite. Şanţuri mai scurte pot fi tăiate cu ajutorul a două lame de ras montate paralel de o parte şi de alta a unei plăcuţe de plexiglas, a cărei grosime va hotărî lăţimea şanţului tăiat. Şanturi mai lungi sau orificii de diferite forme pot fi tăiate cu ajutorul unor perforatoare sau cuţite confecţionate din tablă zincată ascuţită. Aranjarea reciprocă a orificiilor poate fi realizată prinzînd într-o matriţă de plexiglas perforatoarele astfel, încît cu o singură mişcare să se taie toate orificiile necesare. Această operaţie se poate realiza şi prin introducerea unui tipar de hîrtie dedesubtul plăcii şi tăierea pe rînd a orificiilor corespunzătoare.

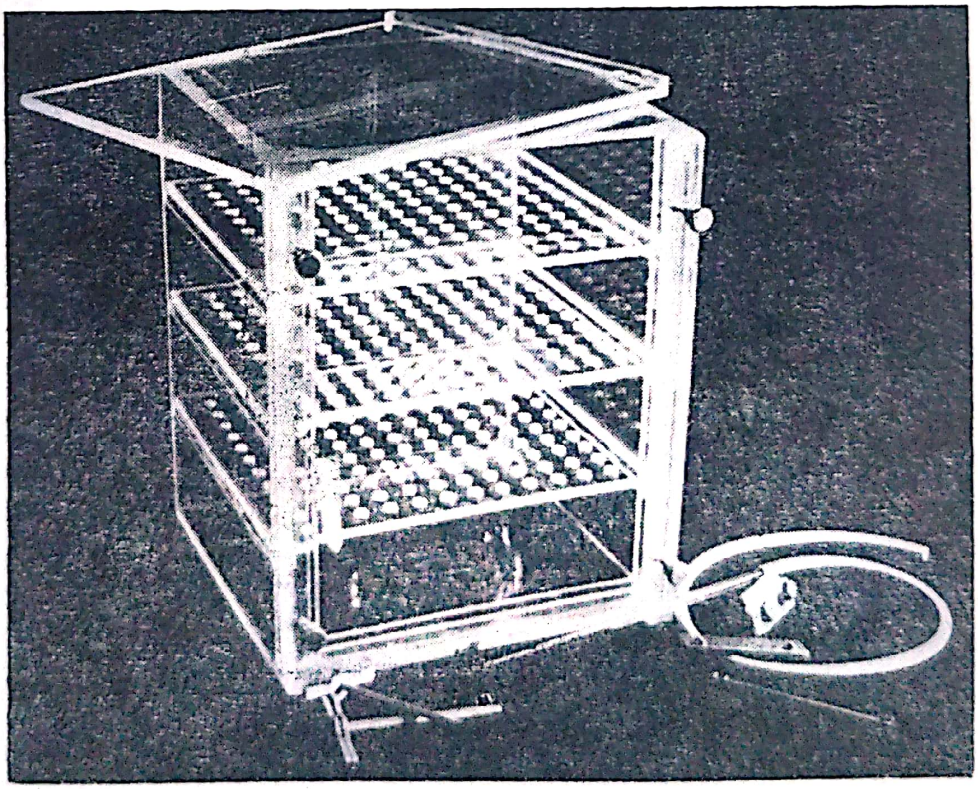


Fig. 78. — Camera umedă pentru imunodifuziune şi cîteva instrumente de tăiat gelul de agar.

Scanned with OKEN Scanner

Rondelele sau fîşiile de agar tăiate pot fi scoase cu ajutorul unui cuţit fin sau prin aspirare cu o pipetă Pasteur, fixată la o trompă de vid.

După umplerea orificiilor sau a şanturilor cu reactivii respectivi, plăcile supuse imunodifuziei se introduc într-o cameră umedă. Un model simplu, multicompartimentat, construit din plexiglas, este reprezentat în figura 78.

Umiditatea în incintă se menţine întroducînd o cutie Petri umplută cu apă. Pentru a preveni infectarea apei se adaugă cîteva cristale de sulfat de cupru sau mertiolat 0,02%. Plăcile sînt ţinute pentru difuzie în aceste incinte între 2 şi 7 zile, după tipul de analiză efectuat.

3. Examinarea şi fotografierea plăcilor

Liniile de precipitare care se formează în gel se observă la lumina zilei, ţinînd placa la o anumită înălţime deasupra unui fond întunecos (hîrtie neagră mată sau o bucată de catifea de aceeaşi culoare). Mai multe detalii apar la examinarea plăcilor cu ajutorul unei iluminări oblice, folosind un fond întunecat (fig.79).

Aparatul este construit din tablă zincată şi este alcătuit dintr-o coroană de becuri mate, aşezate în jurul unui cilindru cu interiorul vop-

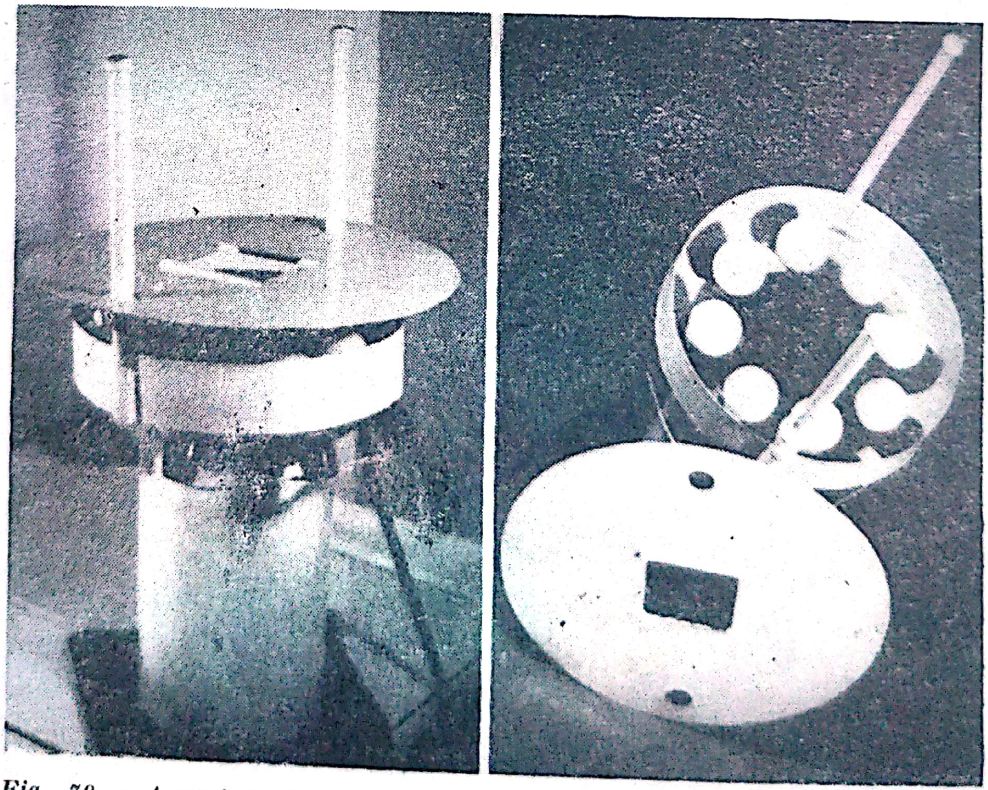


Fig. 79. — Aparat pentru examinarea şi fotografierea liniilor de precipitare pe fond întunecat (adaptat după G. W. Nace, 1961).

Scanned with OKEN Scanner

sit în negru mat. Deasupra becurilor glisează un suport orizontal circular, care are în partea sa centrală o deschidere de forma plăcilor care se examinează. Această fantă este aşezată exact deasupra cilindrului şi se înscrie în circumferinţa acestuia. Suportul circular cu placa de examinat se aşază la o distanţă optimă de becuri, astfel ca în ochiul observatorului sau în obiectivul aparatului fotografic să nu cadă decît razele dispersate de liniile de precipitare. Razele de lumină care cad în interiorul cilindrului sînt absorbite astfel că liniile de precipitare apar albe pe fondul negru al cilindrului.

Pentru fotografiere, plăcile se introduc într-o cuvă de sticlă şi se acoperă suprafaţa gelului cu un strat de cîţiva milimetri de soluţie salină fiziologică. Cuva de sticlă cu placa se aşază deasupra fantei suportului circular şi se fotografiază. Imersarea plăcilor în ser fiziologic are ca scop eliminarea petelor de lumină care apar în jurul orificiilor din gel. Cuva de sticlă se construieşte din plăci fotografice.

Pentru fotografiere se folosesc filme contrast cu o sensibilitate scăzută. Filmele ortocromatice Agfa cu o sensibilitate de 12 Din dau rezultate bune. O fotografie bine executată poate să evidenţieze mai multe linii de precipitare decît se pot observa cu ochiul liber. Imaginile se pot mări de cîteva ori fără a se înrăutăţi calitatea reproducerii.

În afară de această metodă, care necesită o sursă de iluminare şi un aparat fotografic, se mai poate folosi o metodă de contact simplă şi rapidă. Se aşază placa cu partea de sticlă deasupra unei hîrtii fotografice şi se cufundă cu grijă într-o baie de soluţie fiziologică. Operaţia se efectuează la lumină roşie. Se ilumineză apoi gelul un timp determinat (în funcţie de intensitatea iluminării şi sensibilitatea hîrtiei folosite) şi apoi se developează în mod obişnuit. Liniile de precipitare umbresc hîrtia fotografică în zonele în care sînt etalate şi lasă o urmă albă, care contrastează cu fondul negru al hîrtiei fotografice. Cu această metodă nu se pot înregistra decît liniile de precipitare intense şi nete. De multe ori, liniile de precipitare vizibile cu ochiul nu pot fi fotografiate prin această metodă.

În sfîrşit liniile de precipitare pot fi fotografiate şi după colorarea lor. Cum în această formă plăcile pot fi manipulate mai uşor, ele pot fi fotografiate şi în afara laboratorului, într-un atelier fotografic.

4. Prelucrarea gelului după încheierea imunodifuziei

Sînt trei operaţiuni principale: spălarea, uscarea (uneori fixarea) şi colorarea. Toate concură la păstrarea indefinită a plăcilor, la evidenţierea unor linii invizibile înainte de colorare şi la caracterizarea unor antigene dotate cu proprietăţi speciale (enzime, lipo- şi glicoproteine).

Scanned with OKEN Scanner

Spălarea

Spălarea plăcilor se efectuează cu soluţii care să permită îndepărtarea cît mai completă a substanţelor nereacţionate sau a celor aflate în exces, fără a afecta însă integritatea nici unei linii de precipitare.

Din gelul de agar pot fi îndepărtaţi prin spălare minuţioasă toţi componenţii proteici nespecifici aduşi de serul imun însă nu întotdeauna el poate fi eliberat şi de antigenele nereacţionate, în special dacă acestea sînt bazice. Antigenele bazice, încărcate pozitiv, se leagă de grupările electronegative ale agarului şi nu pot fi extrase nici prin spălare prelungită. În acest caz, în jurul orificiilor în care a fost aplicat antigenul (la dubla difuzie) sau în diferite regiuni ale plăcii (la imunoelectroforeză) se formează zone care se vor colora intens, mascînd liniile de precipitare. Acest fenomen indezirabil nu se petrece în agaroză sau se petrece numai într-o măsură mai mică, deoarece acest agent de gelificare nu posedă grupări încărcate electric (fig. 80).

Spălarea plăcilor se face cu o soluţie salină fiziologică tamponată la pH 8,0 cu fosfat 0,02 M şi care conţine 0,02% mertiolat. Această soluţie de spălare, schimbată de trei ori pe zi, permite îndepărtarea produşilor solubili indezirabili în maximum două zile. Creşterea alcalinităţii soluţiei pînă în jurul pH-ului 9,0 (tampon carbonat 0,05 M) scurtează durata spălării, dar poate determina şi dizolvarea unor linii de precipitare. Schimbarea soluţiei de spălare se face prin scoaterea plăcii, înlocuirea soluţiei şi imersarea plăcii; nu se va schimba soluţia păstrînd placa în baie, deoarece mişcarea suprafeţei de lichid determină desprinderea gelului. Dacă după spălare în orificii rămîn precipitate ele pot fi îndepărtate mecanic cu un beţişor de lemn. După spălare, plăcile se imersează în apă distilată pentru cîteva ore, pentru îndepărtarea sărurilor.

Uscarea şi fixarea

Plăcile spălate se aşază pe o suprafaţă orizontală şi se acoperă cu atenţie cu hîrtie de filtru umezită. Se suprapun 5 foi de hîrtie de filtru, se taie după forma plăcilor, se umezesc uniform şi se aplică pe suprafaţa gelului. Acest strat gros de hîrtie de filtru acţionează în cursul uscării ca o pompă aspiratoare care scoate din gel, o dată cu lichidul, şi urmele de substanţe solubile indezirabile. Această acţiune are loc deoarece blocul de hîrtie se usucă mai repede în partea sa superioară decît în partea lipită de gel şi realizează o mişcare de lichid şi substanţe solubile din gel spre suprafaţa hîrtiei.

În aceste condiţii uscarea durează aproximativ 24 de ore. Dacă este necesară o uscare rapidă, se acoperă gelul numai cu o singură hîrtie de filtru şi se introduce într-un termostat la 37°C. Acoperirea suprafeţei gelului cu hîrtie este necesară deoarece previne formarea crăpăturilor şi distorsiunilor în gel. O placă bine uscată trebuie să fie perfect transparentă, filmul de agar aderent, iar liniile de precipitare trebuie să se observe ca nişte

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

contururi translucide. O placă uscată şi necolorată poate fi examinată pe fond întunecat (nu însă şi fotografiată), dacă se umezeşte cu apă distilată suprafaţa ei. După examinare, filmul de agar umezit se lasă să se usuce la temperatura camerei fără nici o precauţiune specială.

Fixarea nu este necesară pentru prelucrarea plăcilor de imunodifuzie, deoarece antigenul şi anticorpul se fixează reciproc în cursul reacţiei de precipitare. Fixarea se practică în special pentru pregătirea electroforegramelor în gel de agar, în vederea colorării.

Fixarea proteinelor separate în gelul de agar sau agaroză se realizează eficient introducînd pentru cel puţin 3 ore plăcile într-o soluţie apoasă de etanol 60° care conţine 2% acid acetic. Sînt folosiţi rar fixatori mai slabi (soluţie apoasă de acid acetic 2%) sau mai drastici (clorură mercurică 1% în acid acetic 1%) fără avantaje notabile.

Fixarea polizaharizilor se face cu etanol 96°. În funcţie de proprietăţile enzimatice ale antigenului trebuie folosiţi acei fixatori care nu-i alterează activitatea sau pur şi simplu să nu se folosească fixatori.

Colorarea (34) (33)

Colorarea plăcilor urmăreşte nu numai evidenţierea netă a liniilor de precipitare sau a fracţiunilor electroforetice separate, ci şi caracterizarea antigenelor implicate în reacţia imună. Este astfel posibil să se realizeze, într-o singură experienţă, identificarea constituentului prin mobilitatea sa electroforetică, specificitate imunologică şi reactivitate chimică.

Reactivitatea chimică a antigenului se manifestă nu numai prin prezenţa grupărilor funcţionale caracteristice proteinelor, ci şi a altor grupări caracteristice lipidelor, glucidelor, acizilor nucleici, complexelor minerale, enzimelor etc. De aceea metodele de colorare urmăresc evidenţierea acestor componenţi.

Colorarea proteinelor. Printre agenţii de colorare întrebuinţaţi curent se numără : albastru de bromfenol, amidoschwartz 10 B, azocarmin, nigrosină şi roşu ponceau. Colorantul se prepară după următoarea reţetă : 1 g de amidoschwartz (sau albastru de bromfenol, azocarmin, nigrosină şi roşu ponceau) se dizolvă în 1000 ml tampon acetat-glicerinat (450 ml acid acetic + 450 ml de acetat de sodiu 0,1 M + 100 ml de glicerol).

Se imersează plăcile uscate în acest colorant timp de minimum 3 ore (dacă s-a folosit roşu ponceau numai 20 min). Se îndepărtează colorantul şi se spală plăcile cu o soluţie de acid acetic 2% care conţine 15% glicerol. Spălarea durează pînă cînd zonele care nu conţin proteină s-au decolorat complet (aproximativ o oră, cu schimbări repetate ale apei de spălare). Plăcile spălate se scurg şi se usucă în poziţie verticală la temperatura camerei. Glicerolul se adaugă la colorant şi la apa de spălare numai dacă se urmăreşte scoaterea filmului de agar de pe plăci. Proporţia optimă de glicerol depinde de tipul de agar şi de concentraţia gelului.

Liniile de precipitare obţinute cu antiserul preparat pe cal se colorează cel mai bine cu azocarmin, iar cele obţinute cu antiseruri de iepure, cu roşu ponceau sau amidoschwartz.

Colorarea lipidelor și a lipoproteinelor. Se prepară o soluție saturată de negru de sudan (sudan black) în etanol 60%. Soluția se prepară adăugînd 1 g colorant la 1 000 ml de soluție alcoolică. Se refluxează amestecul 1 oră sau se ține 24 de ore la 37°C, cu agitare ocazională. Se aduce la temperatura camerei și se filtrează de două ori peste hîrtie de filtru de bună calitate (Whatman 1). Se păstrează în vase închise, ferite de lumină.

Plăcile se introduc în această soluție pentru minimum 2 ore. Cuvele pentru colorare trebuie să fie etanș închise pentru a nu se modifica concentrația de etanol din soluție. Se spală plăcile cu o soluție de etanol 50% (2—3 spălări de cîte 10—15 min fiecare) și apoi se usucă la temperatura camerei sau la 37°C.

Placa pe care s-au colorat lipidele poate fi supracolorată pentru proteine, folosind însă un timp de colorare de numai 1 oră.

Colorarea glicoproteinelor și a polizaharidelor (34). Se dizolvă 1,5 g de fucsină bazică în 500 ml de apă distilată adusă la fierbere. Se filtrează soluția la cald. După răcirea ei pînă 40°C se adaugă repede sub agitare 25 ml HCl 2 N și 3,75 g de metabisulfit de sodiu. Se ține soluția la frigider într-un recipient închis 16—24 de ore și apoi se adaugă 1,5 g cărbune animal. Se agită 1 minut și se filtrează rapid. Dacă soluția nu se decolorează, se mai poate adăuga o mică cantitate de cărbune animal. Soluția se păstrează la frigider. Ea poate fi întrebuințată pînă cînd nu începe să se înroșească.

Plăcile se țin 10 min într-o soluție de acid periodic 1% (preparată în acetat de sodiu 0,2 M). Se spală cu apă curentă 10 min. Se introduce soluția de fucsină, diluată în prealabil 1 :1 cu apă distilată, și se lasă în contact cu plăcile 3 min. Se spală din nou plăcile de 3 ori cîte 2 min cu o soluție de acid sulfuros (50 ml dintr-o soluție 10% de metabisulfit se amestecă înainte de folosire cu 50 ml HCl 2 N și se aduce la 1 000 ml cu apă distilată). Se îndepărtează soluția de spălare și se lasă plăcile pentru 1—2 ore într-o soluție de acid sulfuros, preparată ca mai sus, dar care conține 20% glicerol. Se usucă plăcile la temperatura camerei sau în termostat la 37°C.

Colorarea acizilor nucleici și a nucleoproteinelor (35). La prepararea colorantului se folosesc : 10 ml dintr-o soluție 2% de pironină + 45 ml de acetat de sodiu 0,2 M + 45 ml de acid acetic 0,2 M. Plăcile se imersează în această soluție pentru 1 oră. Se spală apoi cu un tampon acetat (se amestecă volume egale de acid acetic și acetat de sodiu 0,4 M) pînă cînd se decolorează fondul de agar. Se usucă plăcile prin încălzirea lor cîteva minute într-o etuvă la 80—90°C. ARN-ul și ADN-ul se colorează în roșu. Metoda poate detecta 5 μg acid nucleic/probă analizată. Pentru a diferenția ARN-ul de ADN se poate trata în prealabil proba analizată cu ribonuclează. ARN-ul depolimerizat nu mai fixează pironină, astfel că în aceste împrejurări se colorează numai ADN-ul.

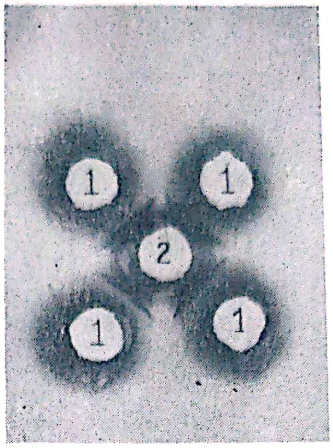
Pironina comercială este de obicei impură. Îndepărtarea impurităților se realizează prin extracția repetată a unei soluții apoase concentrate de pironină Y cu cloroform. Impuritățile sînt solubile în acest solvent.

Detectarea enzimelor în precipitatele specifice. Multe activități enzimatice pot fi evidențiate în precipitatele specifice, folosind plăci cu filme de agar *uscate*. Această comportare arată că agarul este un mediu de protecție pentru enzime și că acestea nu se distrug în cursul uscării plăcilor. În prezent există metode speciale pentru detectarea următoarelor categorii de enzime (34) (33) : esteraze, proteaze, oxidaze, peroxidaze, și dehidrogenaze.

Activitatea enzimatică poate fi decelată și la nivelul fracțiunilor separate prin electroforeză. În aceste cazuri nu se folosește fixarea obișnuită a plăcilor, deoarece se distruge activitatea enzimatică (34).

Scanned with OKEN Scanner

AGAR



AGAROZĂ

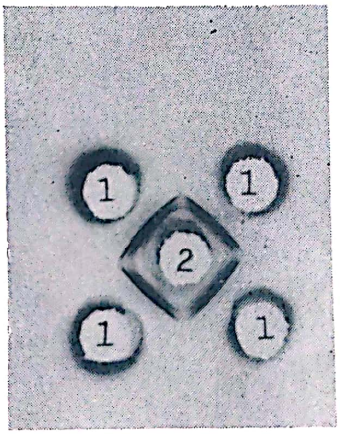


Fig. 80. — Reținerea antigenelor bazice în gelul de agar și agaroză.

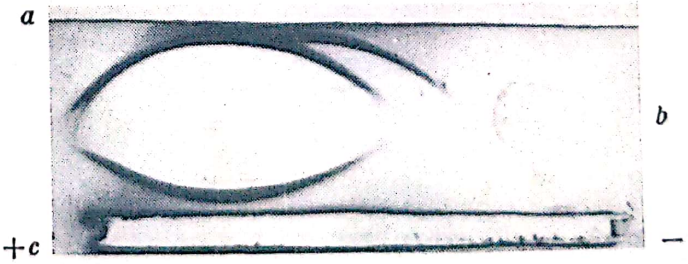


Fig. 81. — Reacția nespecifică între un ser de iepure anti-albumină de șobolan și proteine extrase din ficatul de șobolan. a, Antiser total; b, proteine din ficatul de șobolan; c, anticorpi izolați din antiserul total.

Scanned with OKEN Scanner

5. Utilizarea antiserurilor

Antiserurile utilizate în imunodifuzie sînt obţinute de la specii diferite de animale. Anticorpii de iepure formează cu antigenul corespondent precipitate care sînt insolubile în exces de anticorp şi slab solubile în exces de antigen. Anticorpii de cal formează precipitate imune, care sînt uşor şi complet solubile atît în exces de anticorp, cît şi în exces de antigen. Aceste diferenţe se manifestă pregnant în imunodifuzie. Antiserul de cal dă linii mai subţiri şi mai net conturate decît cel de iepure, dar este mai susceptibil de a furniza rezultate neconcludente dacă nu este folosit în concentraţii optime, corespondente zonei de echivalenţă.

Antiserurile de pasăre sînt capabile să formeze linii de precipitare în mediul gelificat numai la concentraţii saline de 10 ori mai mari decît cele utilizate pentru antiserurile mamiferelor (24) (de exemplu o soluţie de clorură de sodiu 9% în loc de 0,9%). De aceea, evidenţierea imunoelectroforetică a unor antigene cu antiseruri specifice de pasăre se poate executa numai în condiţii tehnice speciale (37).

Antiserurile conţin alături de anticorpii specifici şi un procent însemnat de proteine de balast. Aceste proteine pot interacţiona nespecific cu unele componente dintr-un amestec antigenic complex şi pot forma *false linii de precipitare*. Aceste linii de precipitare nespecifice pot fi o sursă gravă de erori. Ele se evidenţiază prin testarea capacităţii unor seruri normale, obţinute de la animale neimunizate , de a reacţiona cu amestecul antigenic dat. Pentru eliminarea acestor reacţii nespecifice se pot folosi în locul antiserurilor, preparate de anticorpi izolate din antiseruri printr-o precipitare cu sulfat de amoniu (fig. 81). Din figură se observă că linia de precipitare corespunzătoare fracţiunii cu mobilitate mai mică dispare dacă se foloseşte un preparat de anticorp în locul antiserului corespunzător, dovadă că ea era *nespecifică*.

II. DUBLA DIFUZIE DUPĂ OUCHTERLONY (26) (27)

1. Metodologia

Se prepară la cald, pe baia de apă, o soluţie apoasă de agar 1,0 — 1,5%. Soluţia caldă se toarnă în cutii Petri sau pe plăci de sticlă într-o cantitate astfel aleasă ca să se realizeze un gel cu grosimea dorită (nu mai mare de 0,5 cm). Se lasă să se solidifice gelul şi apoi se escavează orificii cărora formă şi aşezare depind de scopurile analizei. Se umplu orificile cu soluţia de antigen de analizat respectiv cu anticorpul specific şi plăcile se introduc într-o cameră umedă. Se examinează periodic plăcile, notîndu-se sau fotografiind dinamica apariţiei diferitelor linii de precipitare. Cînd imaginea s-a stabilizat, se spală plăcile cu o soluţie adecvată. Se îndepărtează astfel componenţii nereacţionaţi sau aflaţi în exces. Se acoperă gelul cu hîrtie de filtru umezită şi se usucă. Placa cu filmul de agar uscat

Scanned with OKEN Scanner

se colorează cu ajutorul unui colorant specific pentru proteine sau pentru alte componente. Se fotografiază placa sau se desenează liniile, aplicînd pe placă o hîrtie de calc. În ultimul caz se acordă atenţie în special acelor linii care nu apar net în fotografie.

2. Forma şi poziţia liniilor de precipitare

Forma liniilor de precipitare depinde de raportul dintre greutatea moleculară a antigenului şi a anticorpului. Dacă antigenul şi anticorpul au o greutate moleculară asemănătoare, linia de precipitare este *dreaptă*. Dacă antigenul are o greutate moleculară mai mare decît anticorpul, deci o constantă de difuziune mai mică [1], linia de precipitare va fi *curbă*; curbura va fi îndreptată spre orificiul *antigenului*. Dacă antigenul are o greutate moleculară mai mică decît anticorpul, deci o constantă de difuziune mai mare, curbura liniei de precipitare va fi îndreptată spre orificiul *anticorpului* (fig. 82).

Ca regulă generală se poate spune că linia de precipitare se curbează spre reactantul cu greutate moleculară mai mare. Cu cît diferenţa dintre greutatea moleculară a celor doi parteneri este mai mare, cu atît curbura liniei de precipitare este mai mare.

Poziţia liniei de precipitare depinde de constantele de difuziune ale antigenului şi anticorpului şi de raportul concentraţiei lor.

Dacă concentraţia celor doi reactanţi este echivalentă, atunci poziţia liniei de precipitare este determinată numai de raportul constantelor lor de difuziune astfel:

a) Constantele de difuziune sînt egale; linia de precipitare se formează la mijlocul distanţei dintre orificiul antigenului şi al anticorpului.

b) Constanta de difuziune a antigenului este mai mare decît cea a anticorpului; linia de precipitare se formează mai aproape de orificiul anticorpului.

c) Constanta de difuziune a antigenului este mai mică decît cea a anticorpului; linia de precipitare se formează mai aproape de orificiul antigenului (fig. 83).

Dacă concentraţia celor doi reactanţi nu este echivalentă, unul dintre ei fiind în exces, linia de precipitare se va forma mai aproape de componenta aflată în concentraţie mai mică (fig. 84).

Dacă antigenul se găseşte în exces, atunci precipitatul se va dizolva în partea orientată spre orificiul antigenului şi se va forma mai aproape de anticorp; deci linia de precipitare va suferi o deplasare de la antigen spre anticorp. În cazul excesului de anticorp se va petrece fenomenul invers, dar numai pentru antiserul de tip cal. Antiserurile de tip iepure

[1] Constanta de difuziune variază invers proporţional cu greutatea moleculară.

Scanned with OKEN Scanner

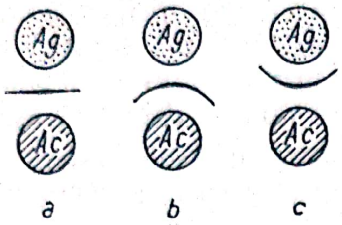


Fig. 82. — Forma liniilor de precipitare în raport cu greutatea moleculară a reactanților. a, Antigenul și anticorpul au greutatea moleculară asemănătoare; b, antigenul are greutatea moleculară mai mică decît anticorpul; c, antigenul are greutatea moleculară mai mare decît anticorpul.

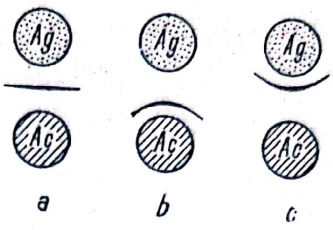


Fig. 83. — Poziția liniilor de precipitare în raport cu greutatea moleculară a antigenului și a anticorpului (concentrațiile lor s-au presupus echivalente). a, Antigenul și anticorpul au constanța de difuziune egală; b, antigenul are constanta de difuziune mai mică decît anticorpul; c, antigenul are constanta de difuziune mai mare decît anticorpul.

vor produce o lărgire continuă a liniei de precipitare, fără dizolvarea ei. Linia se va estompa și își va pierde claritatea. Din această comportare se poate trage concluzia că la punctul de echivalență se formează o linie de precipitare net delimitată, care nu se deplasează în gel în timpul experienței, ci doar crește în dimensiuni.

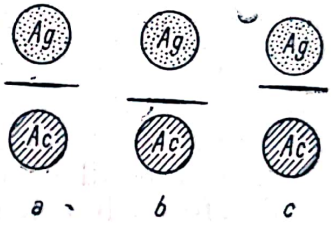


Fig. 84. — Poziția liniilor de precipitare în raport cu concentrația antigenului și a anticorpului (greutatea lor moleculară s-a presupus asemănătoare). a, Antigenul și anticorpul au concentrații egale; b, antigenul are o concentrație mai mică decît anticorpul.

3. Numărul liniilor de precipitare

Numărul de linii de precipitare observate în gel nu indică numărul sistemelor independente antigen—anticorp prezente, ci face numai o estimare minimă a acestora. Deoarece pe o suprafață limitată se pot găsi etalate un număr mare de linii de precipitare este posibil ca unele linii mai slabe să fie mascate de linii mai puternice. De asemenea, este posibil ca unele antigene din amestecul analizat să nu se găsească în raportul optim cu anticorpul corespunzător și astfel să nu determine apariția unui precipitat vizibil.

De aceea, pentru determinarea numărului de antigene ale sistemului analizat este absolut necesară efectuarea reacției, folosind diferite diluții de antiser și de antigen pînă la limita sensibilității reacției. Această operație permite să se pună în evidență antigenele aflate în amestecul inițial într-o concentrație nefavorabilă reacției de precipitare.

Se procedează astfel : se face un aranjament al orificiilor în formă de hexagon (fig.85,*a*). În orificiul central se introduce antiserul nediluat și în cele 6 orificii înconjurătoare diluții succesive ale soluției de antigen.

În exemplul dat se constată că linia de precipitare dinspre orificiul antigenului apare net numai la diluția 1 :1 ; linia de precipitare mijlocie este prezentă către diluția 1 :1 și 1 :8, iar linia dinspre orificiul anticorpului se observă bine abia la diluția 1 :4, dar se menține pînă la diluția 1 :32.

Acest aranjament trebuie repetat de cîteva ori, folosind de fiecare dată un antiser într-o diluție din ce în ce mai mare (pînă la 1 : 100) și diluții mai avansate ale antigenului (pînă la 1 :1 000). Este evident că *folosind o proporție de antigen și anticorp aleasă întîmplător* este posibil ca un număr de componente existente în sistem să nu fie decelate.

Pentru determinarea numărului de linii de precipitare dă rezultate bune și aranjamentul cu centrul deplasat (9) (fig. 85,*b*). În cazul acestei scheme se pun în evidență componenți care reacționează net, atît la distanțe mici, cît și la distanțe mari, ceea ce înlesnește determinarea numărului de linii de precipitare.

Linii de precipitare secundare (false)

Un sistem imun, format dintr-un *singur* antigen și anticorpul corespondent, este capabil să dea naștere unei *singure* linii de precipitare. Tendința de a forma linii de precipitare secundare se manifestă în cazul în care unul din cei doi reactanți se găsește într-un mare exces sau dacă orificiile se încarcă a doua oară cu soluția de antigen (greșeală comisă adeseori de unii experimentatori, dornici să obțină linii de precipitare mai intense).

Formarea falselor linii de precipitare se datorește faptului că linia de precipitare formată inițial este penetrabilă pentru reactantul în exces. Acesta străbate linia de precipitare, întîlnește pe celălalt reactant la o concentrație convenabilă pentru formarea precipitatului și determină apariția unei noi linii de precipitare secundare, într-o zonă adiacentă de de linia de precipitare principală.

Liniile de precipitare secundare dispar din plăci dacă se variază raportul dintre concentrația reactanților. Uneori ele se pot deosebi de liniile de precipitare „adevărate" prin aceea că își unesc extremitățile cu cele ale liniei de precipitare principale.

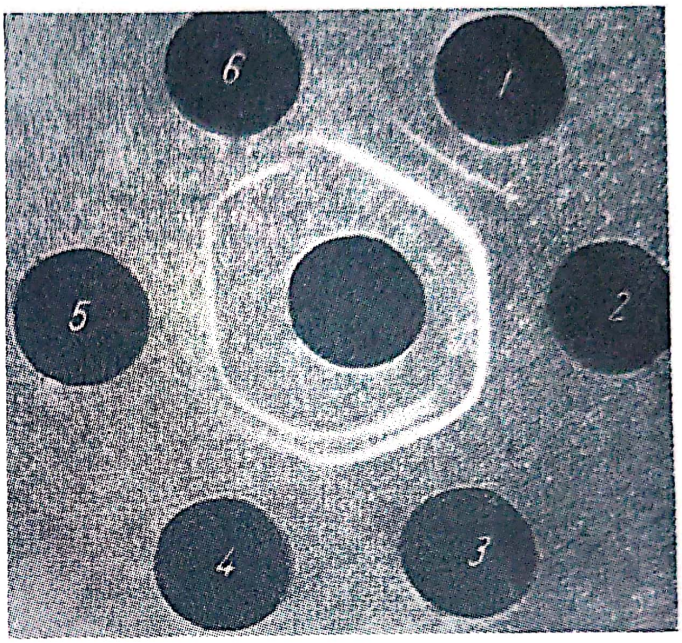
4. Identificarea liniilor de precipitare

Dubla difuziune permite identificarea diferitelor linii de precipitare cu ajutorul unor antigene cunoscute, folosite ca substanțe de referință.

Pentru a putea compara reacția antigenului de referință și a celui studiat cu antiserul corespondent, se așează cei trei parteneri de reacție în colțurile unui triunghi al cărui unghi de vîrf poate varia între 60 și 90°. Diametrul orificiilor poate varia între 0,2 și 0,6 cm (după cantitatea de antigen de care dispune experimentatorul), iar distanța dintre marginile godeurilor care conțin antigenul și anticorpul nu trebuie să

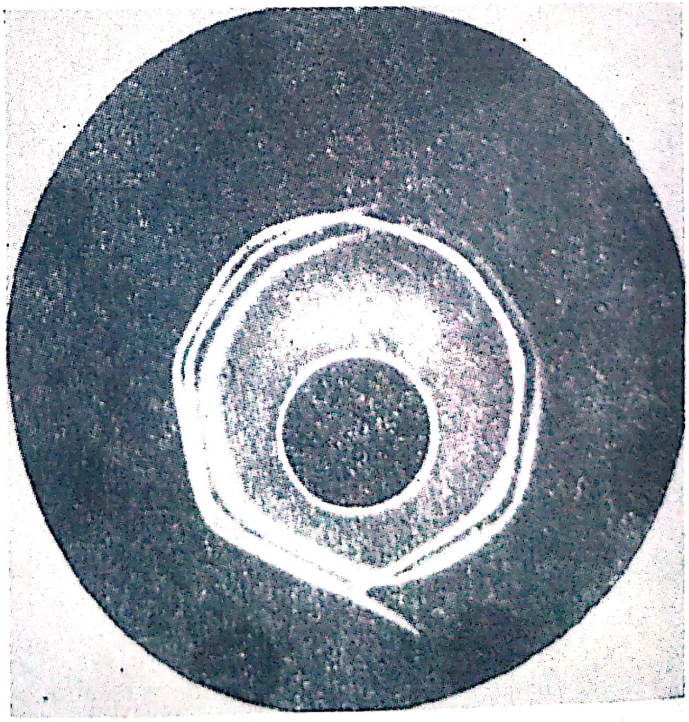
Scanned with OKEN Scanner

Fig. 85. — Sisteme pentru numărarea liniilor de precipitare.



a

a, Aranjamentul pentru diluarea antigenului (după A. L. Zilber şi colab., 1962).



b

b, aranjament cu centrul deplasat (după J. Feinberg, 1957).

Scanned with OKEN Scanner

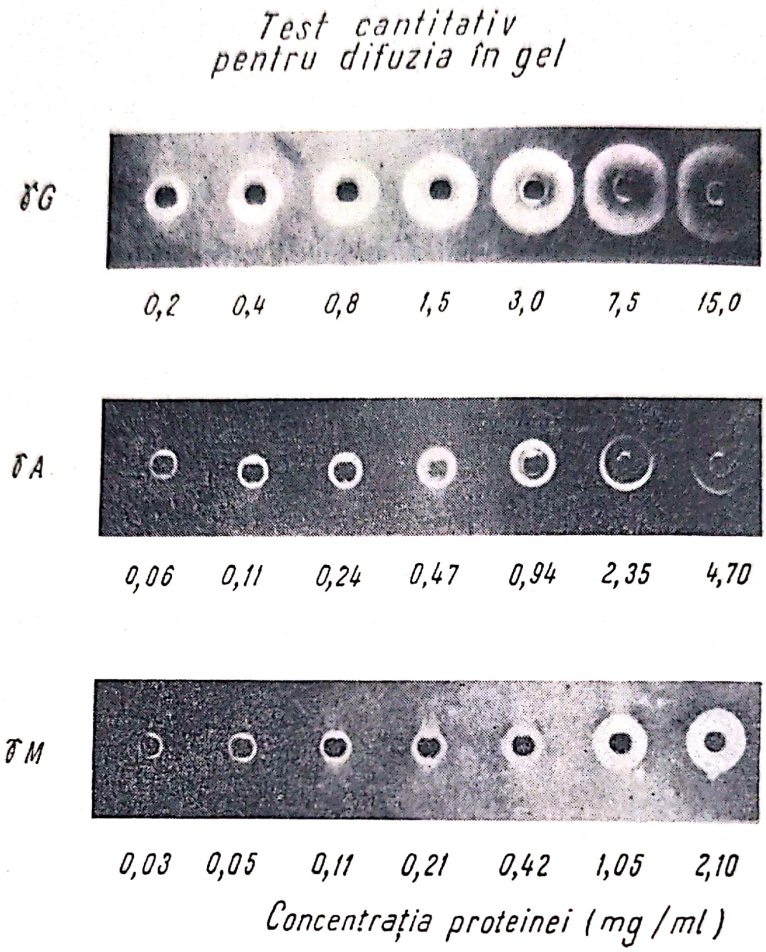


Fig. 87. — Inele de difuziune obținute în plăci de agar, conținînd anticorpi specifici cu diluții succesive ale imunoglobulinelor γG, γA și γM (după J. Fahey și colab., 1965).

Scanned with OKEN Scanner

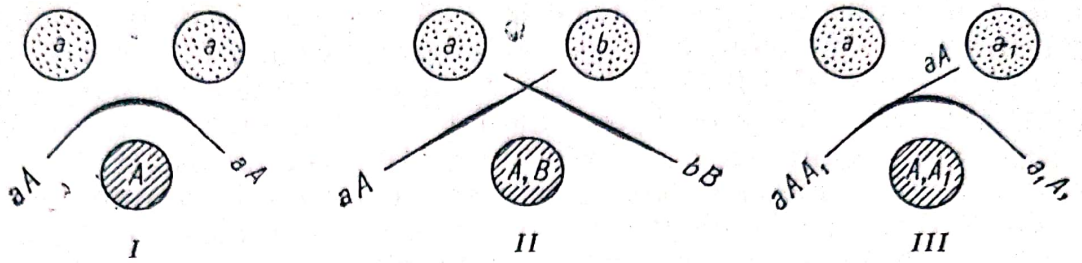


Fig. 86. — Reacţii de identificare (după A. L. Zilber şi colab., 1962). *I Reacţie de identitate: a, antigen, A, anticorpul specific; II reacţie de neidentitate: a şi b, antigene fără înrudire imunochimică, A şi B, anticorpi specifici; III reacţie de identitate parţială: a şi a_1, antigene care posedă grupări comune şi specifice; A, anticorpi faţă de gruparea specifică a; A_1, anticorpi faţă de ambele grupări, a şi a_1.*

depăşească de două ori diametrul lor (se fac cîteva aranjamente cu distanţe diferite). Se pot întîlni trei situaţii principale (fig. 86) :

Reacţia de identitate. În cele două godeuri superioare se introduc antigenele care urmează a fi comparate, iar godeul din vîrful triunghiului se umple cu antiser. La întîlnirea zonelor de difuziune dintre antigen şi anticorp se depune un precipitat. Dacă antigenele sînt identice, atunci zonele lor de difuziune se unesc şi formează un front comun. Acest front întîlneşte zona de difuziune a anticorpilor şi formează o linie de precipitare arcuită comună (fig. 86, *I*). Contopirea benzilor de precipitare dovedeşte identitatea antigenelor comparate (figura 70, *a*). Dacă cele două antigene sînt identice, dar nu se găsesc în cantităţi egale, liniile de precipitare se unesc însă cele două ramuri nu mai sînt simetrice ; cea care s-a format în dreptul godeului cu antigenul mai diluat este mai apropiată de godeu.

Dacă se compară două sisteme complexe care conţin cîteva antigene identice, iar în antiser există anticorpi faţă de ele, atunci în mod corespunzător se vor forma tot atîtea linii de precipitare fuzionate cîte antigene comune există. Deoarece precipitatele formate în gel nu reţin antigenele şi anticorpii neînrudiţi, se vor forma tot atîtea linii de precipitare nefuzionate cîte antigene specifice există în amestecurile analizate.

Reacţia de neidentitate. Dacă preparatele analizate conţin antigenele specifice *a* şi *b*, care nu prezintă înrudire imunochimică, iar antiserul conţine anticorpii respectivi faţă de cele două componente (*A* şi *B*), atunci fiecare pereche de antigen-anticorp dă o linie de precipitare independentă (fig. 86, *II*). Aceste linii se vor întretăia. Întretăierea liniilor de precipitare dovedeşte diferenţierea imunochimică totală a celor două antigene şi este o dovadă sigură că fiecare din ele prezintă grupări determinante particulare (reacţia dintre *F* şi *S* în figura *70, b*).

Reacţia de identitate parţială. Înrudirea parţială a două antigene (*a* şi a_1) se poate evidenţia cu ajutorul unui antiser preparat faţă de unul din antigene (de ex. faţă de *a*). Antiserul va conţine două feluri de anticorpi : unii capabili să reacţioneze numai cu antigenul omolog care a servit la imunizare (*A*) şi alţii capabili să reacţioneze atît cu antigenul care a servit la imunizare, cît şi cu cel înrudit (A_1). Pe seama ultimului grup de anticorpi apare

linia de precipitare comună dintre cele două antigene. Linia de precipitare dintre antiser şi antigenul omolog se prelungeşte formînd aşa numitul *pinten* (fig. 86 *III*). Pintenul se formează datorită precipitării antigenului omolog *a* de către anticorpii specifici *A*, care nu dau reacţii încrucişate cu antigenul înrudit. De aceea anticorpii *A* străbat linia de precipitare a_1 A_1 şi se întîlnesc cu antigenul omolog dincolo de bariera de precipitat, formînd pintenul care atestă o reacţie de identitate parţială (reacţia dintre γ şi *F* sau *S* în figura 70, *b*). Lungimea şi intensitatea pintenului sînt invers proporţionale cu gradul de înrudire antigenică a celor două antigene analizate. În cazul în care se compară două antigene, care sînt diferite însă prezintă un anumit grad de înrudire antigenică, cu un al treilea antigen şi se foloseşte antiserul faţă de acest al treilea antigen, se poate forma un dublu pinten. În unele cazuri, dublul pinten se aseamănă cu o intersecţie (reacţie de neidentitate); antigenele nu pot fi totuşi confundate, deoarece pintenii prezintă o bruscă îngustare a liniei dincolo de punctul lor de joncţiune.

Pintenul fals. Uneori, la compararea a două sisteme care conţin una şi aceeaşi componentă în diferite concentraţii se obţine o reacţie de identificare parţială, adică în locul contopirii totale a liniilor de precipitare se formează un pinten. Fenomenul se observă adesea la compararea a două preparate, dintre care în unul antigenul se găseşte în proporţii echivalente cu antiserul, iar în celălalt într-un exces mare. Pintenul fals se formează în continuarea liniei de precipitare corespunzătoare echivalenţei. Apariţia pintenului fals se explică prin faptul că precipitatul format de antigenul aflat în exces migrează în direcţia anticorpului mai repede decît are loc dizolvarea precipitatului format în zona proporţiilor echivalente şi acesta va forma pintenul fals. Este de notat că *pintenul fals se reduce în timp, spre deosebire de pintenul autentic, care se măreşte cu trecerea timpului*. Pintenul fals se înlătură uşor, modificînd proporţia reactanţilor.

5. Sensibilitatea metodei

Sensibilitatea metodelor de imunodifuziune se compară favorabil cu sensibilitatea metodelor de imunoprecipitare, dar este indiscutabil mai mică decît a metodelor bazate pe aglutinare, hemoliză sau anafilaxie (tabelul nr. 29).

Dintre metodele de imunodifuziune folosite se pare că dubla difuziune într-o singură dimensiune (tehnica P e e r) este mai sensibilă decît difuziunea simplă după O u d i n şi ambele sînt capabile să detecteze cantităţi mai mici de anticorpi sau antigeni decît tehnica dublei difuziuni radiale (tehnica O u c h t e r l o n y) (19).

Cantitatea cea mai mică de *antigen* care poate fi detectată prin tehnica lui P e e r variază, în funcţie de natura antigenului , între 1 şi 10 μg/ml, în timp ce cu tehnica O u c h t e r l o n y se pot detecta numai cantităţi de cîteva ori mai mari, 3-30 μg/ml. Cantitatea cea mai mică de *anticorpi* care se detectează prin tehnica lui P e e r variază de la un sistem imun la altul între 3 şi 9 μgN/ml şi este de cîteva ori mai sensibilă decît tehnica O u c h t e r l o n y care nu poate detecta cantităţi mai mici de 10 μgN/ml.

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea metodei O u c h t e r l o n y depinde de constantele de difuziune, raportul dintre constantele de difuziune, concentraţiile iniţiale şi distanţa la care sînt aşezaţi antigenul şi anticorpul. Cu cît orificiile în care s-a introdus antigenul şi anticorpul sînt mai apropiate, cu atît sensibilitatea metodei va fi mai mare. Este adevărat însă că, pentru sisteme alcătuite din mai multe antigene, această apropiere este în detrimentul rezoluţiei.

Raportul dintre concentraţiile antigenului şi ale anticorpului are un rol important la determinarea antigenului în sistem. Se folosesc diluţii succesive nu numai ale antigenului, ci şi ale antiserului. Diluarea antiserului echilibrează balanţa dintre antigen şi anticorp, dezechilibrată prin diluarea antigenului, şi determină apariţia unei linii de precipitare la concentraţii mai joase de antigen. De aceea este *o regulă generală* ca la titrarea unui antigen prin dublă difuziune să se folosească diluţii succesive, atît ale soluţiei de antigen, cît şi ale antiserului.

Sensibilitatea metodei de dublă difuziune poate fi mărită de 2-4 ori prin intensificarea liniilor de precipitare cu ajutorul sărurilor de cadmiu (5). După spălarea plăcilor, gelul se acoperă cu o soluţie 0,05 g% de acetat, clorură sau sulfat de cadmiu, preparată în apă distilată, sau soluţie salină fiziologică, tamponată sau netamponată. Intensificarea liniilor de precipitare începe imediat după cufundarea în soluţie şi atinge un maxim cam la 10 min, cînd se fotografiază. Liniile foarte slabe sau invizibile, obţinute cu antigene foarte diluate, apar abia după o imersare de 1—2 ore.

6. Determinarea cantitativă a antigenelor (21) (8)

Metoda constă într-o difuziune radială a antigenului într-o placă de gel în care s-a încorporat anticorpul. Se formează un inel de precipitat imun în jurul orificiilor în care s-a introdus antigenul. Diametrul inelului este proporţional cu concentraţia antigenului.

Se procedează astfel : se prepară o soluţie de agar 3% într-o soluţie salină fiziologică tamponată la pH 8,0, cu 0,02 M fosfat şi care conţine 0,02 g% mertiolat de sodiu. Tot cu această soluţie salină se diluează antiserul pînă la concentraţia dorită (1 : 1—1 : 2). Se introduce soluţia de agar şi antiserul diluat într-o baie de apă adusă la 56°C. Se amestecă apoi volume egale din agar şi din antiser şi se întinde amestecul pe plăci într-o cantitate astfel calculată ca de fiecare dată să se realizeze un strat cu aceeaşi grosime (de obicei 0,1—0,15 cm). Se escavează o serie de orificii cu un diametru de 0,2—0,25 cm echidistanţate la un interval mai mare decît de trei ori diametrul lor. Se umplu orificiile cu soluţia de antigen, avînd grijă să nu se scurgă soluţia pe suprafaţa agarului (se poate folosi o microseringă cu care să se depună întotdeauna *acelaşi* volum).

Se incubează plăcile într-o cameră umedă, la o temperatură constantă. După un timp determinat (de obicei 24—48 de ore) se scot plăcile şi se măsoară diametrul inelelor formate cu ajutorul unei scări care măsoară jumătatea de milimetru.

Scanned with OKEN Scanner

Folosind diluții succesive ale unei soluții de proteină pentru care există un antiser specific, se obțin inele tipice de precipitare, cu atît mai largi, cu cît concentrația proteică este mai mare (fig. 87).

Se pot construi grafice pentru fiecare proteină, comparînd diametrul inelului de precipitare cu logaritmul concentrației proteice. Concentrația proteică a unei probe necunoscute se determină comparînd diametrul inelului ei de precipitare cu curba etalon obținută cu proteina standard.

Cantitatea cea mai mică de antigen care poate fi măsurată cu această metodă corespunde la o concentrație de 1,5-3,0 μg/ml, dacă se folosește și o diluție corespunzătoare a antiserului specific. Precizia metodei este de ± 10% și permite analizarea concomitentă a unui număr mare de probe folosind un volum redus (0,02-0,1ml). Astfel, într-o cantitate de numai 0,25 ml de ser sanguin se pot determina concentrațiile celor trei clase de imunoglobuline.

Deoarece poziția liniei de precipitare în dubla difuziune depinde de concentrația antigenului, se poate aplica și o metodă de măsurare a distanței dintre linia de precipitare și orificiul antigenului în raport cu concentrația antigenului. Folosind condiții standardizate, se pot construi curbe etalon care permit măsurarea concentrației antigenului cu o acuratețe de ± 10% (7). Metoda are avantajul că nu necesită decît cantități mici de antiser și folosește o tehnică obișnuită de dublă difuziune.

III. IMUNOELECTROFOREZA (13) (14) (15)

1. Metodologia

Gelul de agar sau agaroză se prepară ca și pentru dubla difuziune. Singura diferență constă în aceea că dizolvarea agarului se face într-o soluție-tampon al cărei pH și putere ionică sînt astfel alese de experimentator ca să permită cea mai eficientă separare electroforetică a componentelor din amestecul analizat, fără a afecta însă imunoprecipitarea.

Gelul se întinde pe plăci ale căror dimensiuni sînt variabile. Este importantă lungimea plăcii fiindcă pe ea se etalează componentele separate electroforetic. Se folosesc două lungimi (de 15 cm sau mai lungi) pentru tehnica de *macroimunoelectroforeză* și de 7-8 cm (lame de microscop) pentru tehnica *microimunoelectroforetică* (31). Lățimea plăcilor variază în funcție de numărul de probe care urmează să fie analizat în paralel. Pentru tehnica microimunoelectroforetică se pot folosi lame de microscop cu o lățime de 2,5 cm sau plăci de 2—5 ori mai late.

După ce gelul s-a întărit se excavează orificiile în care urmează să fie introdus antigenul. Orificiile se așază la mijlocul plăcii, dacă se folosește agarul, și la extremitatea catodică, dacă se utilizează agaroza. Forma orificiilor este în majoritatea cazurilor circulară. Diametrul lor depinde de tehnica folosită, dar și de cantitatea de antigen de care dispune experimen-

Scanned with OKEN Scanner

tatorul. Pentru macroimunoelectroforeză se taie rezervoare de 8—10 mm diametru, iar la microimunoelectroforeză diametrul orificiilor nu depăşeşte 1,5 mm. Pentru analiza electroforetică în gel de agar se taie un şanţ. Lungimea acestuia trebuie să fie mai mică decît lăţimea plăcii cu cel puţin 0,3 cm la fiecare capăt. Lăţimea şanţului în microtehnică nu trebuie să depăşească 1,5 mm, iar la macroelectroforeză cel mult 3 mm. Cu cît şanţul este mai îngust, cu atît benzile de proteine vor fi mai înguste şi mai net delimitate. În unele cazuri se poate efectua analiza imunoelectroforetică introducînd antigenul în şanţuri şi nu în orificii rotunde.

Proba de analizat dizolvată, pe cît posibil, în tamponul cu care se efectuează electroforeza se încălzeşte la 45°C într-o baie de apă. În aceeaşi baie se introduce şi o mică cantitate de agar fluid, rămasă de la plăci. Cînd ambele soluţii au luat temperatura băii se amestecă în proporţii egale şi se introduc repede în orificiile existente în gel. În cîteva minute agarul se întăreşte şi astfel se reface uniformitatea gelului. Dacă concentraţia soluţiei analizate este mică şi dacă orificiul practicat în agar nu are diametrul prea mare, se poate introduce direct soluţia fără a o amesteca în prealabil cu agar.

Se aşază plăcile în aparatul de electroforeză. Se face legătura între gel şi soluţia tampon prin intermediul unor punţi formate din două hîrtii Whatman 1 alipite sau o singură hîrtie Whatman 3. Benzile de hîrtie se umezesc cu tampon, se zvîntă pe o hîrtie de filtru uscată şi apoi unul din capete se întinde cu grijă pe suprafaţa gelului, evitînd formarea bulelor de aer. Celălalt capăt se lasă să atîrne în soluţia tampon. Capetele gelului acoperite cu hîrtie trebuie să aibă o lungime cam de 0,5 cm pentru micrometodă şi în jur de 1 cm pentru macrometodă.

Se conectează sursa de curent, se ajustează parametrii electrici la mărimea dorită şi se face electroforeza amestecului un timp determinat. Se opreşte curentul, se îndepărtează benzile de hîrtie şi imediat se taie cu ajutorul unor cuţite adecvate şanţurile pentru antiser. Lăţimea şanţurilor este de 2 mm la micrometodă şi de 5 mm la macrometodă însă mărimi ceva mai mici sau mai mari pot fi folosite fără nici un dezavantaj. Distanţa la care se taie aceste şanţuri de orificiul în care a fost introdus antigenul la începutul analizei variază între 3—5 mm, în funcţie de viteza de difuziune şi de concentraţia diferitelor antigene în amestecul analizat. De obicei la macroimunoelectroforeză distanţa dintre orificii este cuprinsă între 5 şi 10 mm, iar la microimunoelectroforeză variază între 3 şi 5 mm.

Un aranjament foarte folosit la macro- şi microimunoelectroforeză este redat în figura 88.

După umplerea şanţurilor cu antiser se introduc plăcile într-o cameră umedă; aici ele se ţin pînă cînd imaginea imunoelectroforetică este stabilizată. La macroimunoelectroforeză formarea liniilor de precipitare se definitivează în 5—7 zile, în timp ce micrometoda necesită un timp mult mai scurt (1—2 zile). Ca şi la dubla difuzie trebuie urmărită cu ochiul şi cu aparatul de fotografiat dinamica apariţiei diferitelor linii de precipitare. În amestecuri complexe de antigen nu rareori se constată că grupuri de linii de precipitare iau aspectul optim pentru fotografiere atunci cînd altele sînt

Scanned with OKEN Scanner

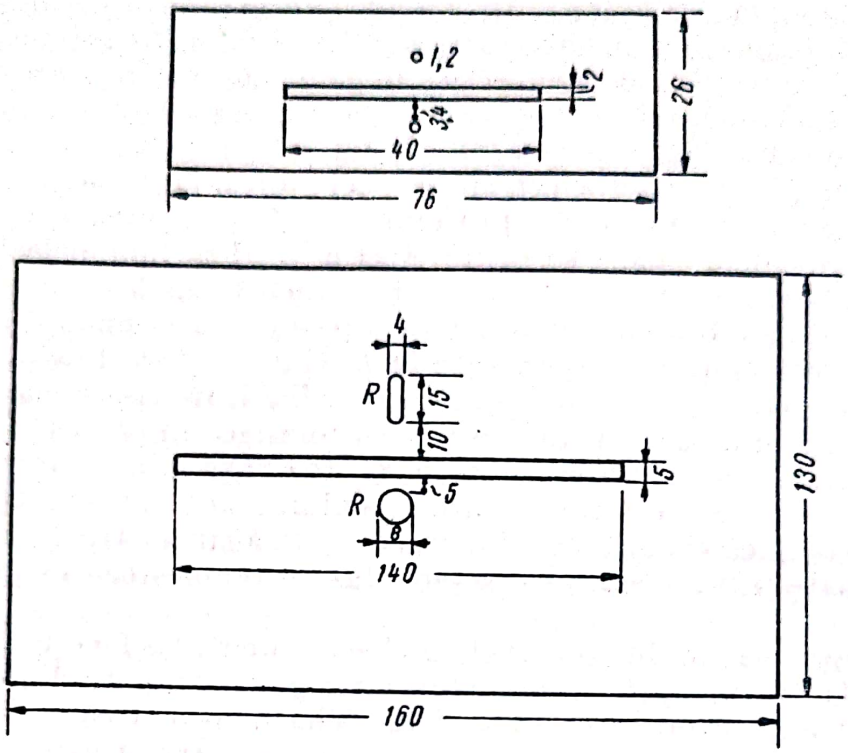


Fig. 88. — Aranjarea reciprocă a rezervorului pentru antigen şi a şanţului pentru anticorp în metoda micro- şi macroimunoelectroforetică (cotele sînt date în mm).

abia în curs de formare sau invers, cînd ultimile se definitivează, primele devin estompate şi se obsearvă mai greu.

După încheierea difuziunii plăcile se spală, se usucă şi se colorează în felul descris la paragraful I.

2. Tehnica electroforetică

Aparatul. Aparatul pentru micro- sau macroelectroforeză se compune dintr-o cutie de plexiglas împărţită în două compartimente, în care se găsesc doi electrozi de platină şi în care se introduce soluţia tampon. Între cele două compartimente, pe un suport, se aşază plăcile cu gel. Camera cu plăcile este etanş închisă cu un capac. Un model simplu care poate fi construit cu mijloace modeste şi care poate fi întrebuinţat atît la macro-, cît şi la microelectroforeză, este reprezentat în figura 89.

Curentul electric este furnizat de o sursă de curent continuu, de obicei un redresor stabilizat. Pentru analizele electroforetice obişnuite se foloseşte un potenţial de 5—10 V/cm pe lungime de placă şi se admite o intensitate maximă de 1 mA pe lăţime de placă. La calcularea potenţialului în V/cm *nu se va folosi citirea de la voltmetrul redresorului*; se va măsura cu un volt-

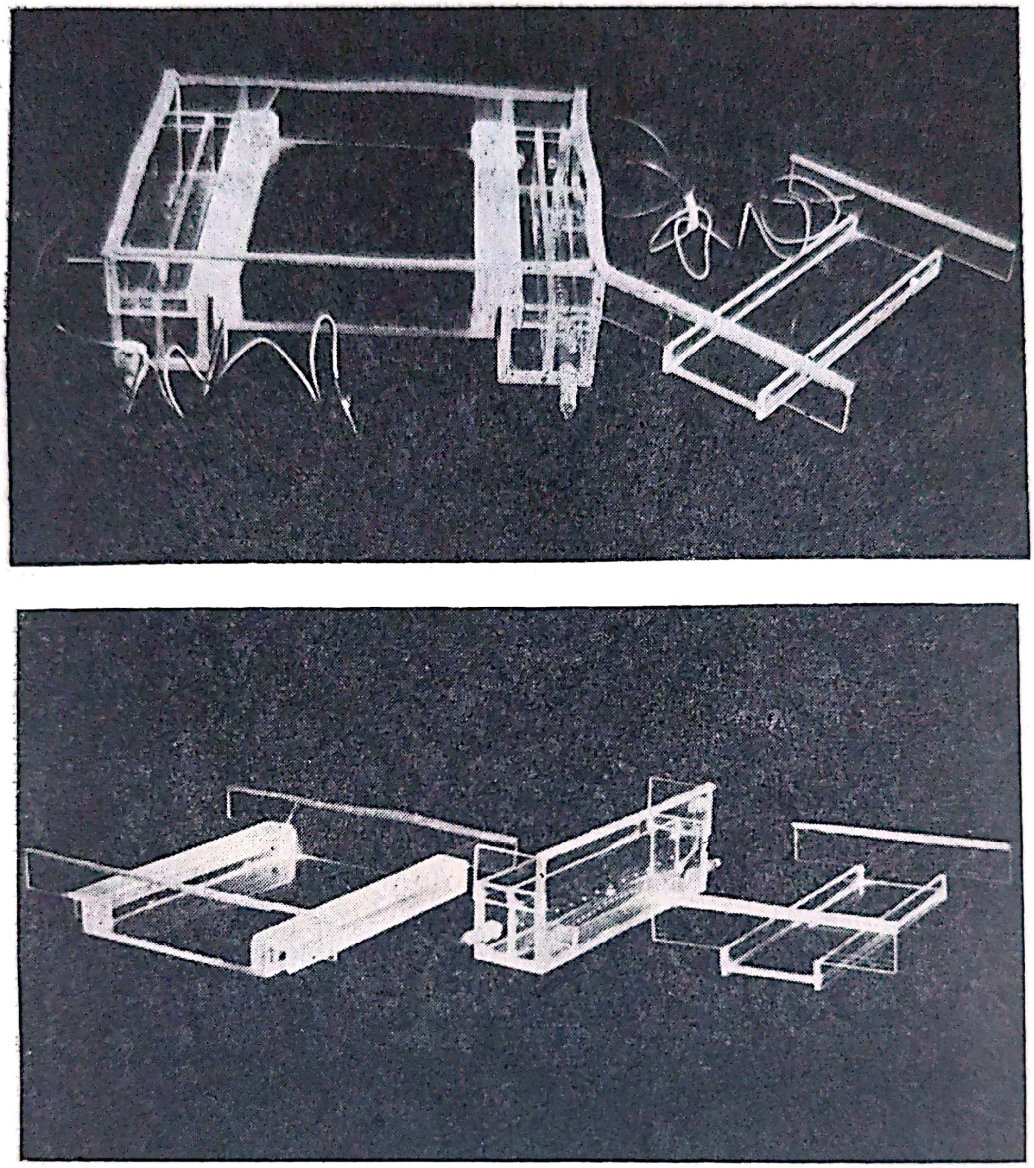


Fig 89. — Aparat de electroforeză în gel de agar.

metru diferența de potențial de la capetele plăcii și se va împărți la lungimea plăcii la care se va aduna și lungimea punților de hîrtie (de la placă și pînă la suprafața tamponului).

Durata analizei depinde, în principal, de mărimea sarcinilor electrice ale componentelor supuse analizei și de potențialul aplicat. Pentru un potențial de 3—4 V/cm, proteinele serice se separă satisfăcător în 6—7 ore (macroelectroforeză). Micrometoda folosește un potențial mai ridicat, de 5—10 V/cm, și permite separarea proteinelor serice în 30—60 min. La analizarea unor substanțe necunoscute este necesar să se oprească analiza la intervale diferite de timp.

Scanned with OKEN Scanner

Tampoane. Soluţiile tampon folosite în imunoelectroforeză reprezintă un compromis între concentraţia de electrolit permisă pentru electroforeză şi cea compatibilă cu formarea liniilor de precipitare. În general, tampoanele folosite în imunoelectroforeză au un pH cuprins între 7,0 şi 8,6 şi o putere ionică de 0,025 -0,1.

Concentraţia soluţiei tampon în plăci poate fi identică cu cea din aparat, dar poate fi de asemenea mai mică sau mai mare (de 2-3 ori). Folosind o concentraţie a tamponului mai mică în plăci decît în aparat, componentele vor avea o viteză de migrare mai mare decît în cazul concentraţiilor egale. Invers, utilizînd o concentraţie mai mare în plăci, scade viteza de migrare a componentelor.

Cele mai folosite tampoane sînt pe bază de dietilbarbiturat de sodiu (veronal sodic). Dăm mai jos cîteva reţete :

a) Veronul sodic 9 g, HCl 0,1 N 65 ml, mertiolat de sodiu 0,2 g, apă distilată la 1 000 ml, pH = 8,6, $\mu = 0{,}05$. Această soluţie se introduce în cuvă ; în plăci soluţia se diluează cu apă distilată 1 : 1.

b) Se dizolvă 47,6 veronal sodic în 4,3 l apă distilată şi se adaugă 69 ml HCl 1 N pentru a coborî pH-ul la 8,2 ; $\mu = 0{,}05$. Această soluţie se introduce în cuvă ; în plăci soluţia se diluează 1 :1 cu apă distilată. Se adaugă mertiolat.

c) Veronal sodic 8,76 g, veronal acid 1,28 g, mertiolat de sodiu 0,2 g, apă distilată la 1 000 ml, pH = 8,6, $\mu = 0{,}05$. Această soluţie se introduce în cuvă ; în plăci soluţia se diluează cu apă distilată 1 : 2. Uneori capacitatea de rezoluţie a tamponului se măreşte dacă se adaugă K_2HPO_4 0,01 M. pH-ul soluţiei scade pînă la 8,2 (10).

O soluţie tampon poate fi folosită de 5—10 ori, avînd grijă să se inverseze polii după fiecare analiză.

Electroendosmoza şi mobilitatea electroforetică. Agarul se încarcă negativ la pH-urile la care se efectuează în mod obişnuit electroforeza cu scopuri imunochimice. De aceea, întregul lichid existent în canaliculele agarului se încarcă pozitiv şi la aplicarea cîmpului electric va migra spre polul negativ. Această deplasare a lichidului este contrară mişcării celor mai multe proteine, care la pH neutru sau alcalin migrează spre polul pozitiv. Datorită electroendosmozei, mobilitatea electroforetică aparentă a componentelor în gel este mai mică decît cea reală. Dacă viteza electroendosmozei este mai mare decît viteza de deplasare a componentelor, atunci acestea vor fi deplasate spre polul negativ deşi ele sînt încărcate tot negativ. Astfel, la electroforeza proteinelor din ser se constată că întotdeauna γ-globulinele şi uneori β-globulinele sînt deplasate spre polul negativ.

Viteza fluxului osmotic este proporţională cu diferenţa de potenţial şi creşte cu mărirea concentraţiei de agar. *Ea scade pe măsură ce forţa ionică a tamponului creşte.* Viteza fluxului osmotic variază chiar de la o porţiune a gelului la alta, pe aceeaşi placă. Datorită acestui fapt apar adeseori anomalii. Astfel, la cîteva minute de la conectarea curentului, în faţa orificiului cu antigen apare o picătură, iar înspre polul negativ o adîncitură. În cursul experienţei picătura şi adîncitura se deplasează spre polul negativ şi pot determina ruperea orificiului şi apariţia unor crăpături în gel în această

regiune. Anomaliile se manifestă cu atît mai puternic, cu cît este mai mare diferenţa de concentraţie a electroliţilor în placa de gel şi în preparatul analizat şi cu cît orificiile au un diametru mai mare. Echilibrînd concentraţia electroliţilor în probă şi în gel (printr-o dializă prealabilă a probei faţă de tamponul folosit la electroforeză) şi perforînd orificii cu diametrul mai mic, aceste anomalii se reduc la dimensiuni neperturbante (38).

Viteza curentului de electroendosmoză este de 3 ori mai mică în gelul de agaroză decît în cel de agar, de aceea probele de analizat nu trebuie aşezate în mijlocul plăcii aşa cum se procedează pentru agar şi se pot aplica la unul din capetele ei.

Ţinînd seama de existenţa electroendosmozei în gelurile de agar şi de agaroză, mobilitatea electroforetică a unui component oarecare se măsoară cu ajutorul ecuaţiei :

$$U = \frac{d}{tE},$$

unde : d = distanţa reală pînă la care ar fi trebuit să migreze substanţa dacă n-ar fi existat electroendosmoza (în cm) ; t = durata analizei (în sec) ; E = cîmpul electric (în V/cm).

Se obsearvă că unitatea de măsură pentru mobilitatea electroforetică este :

$$U = \frac{\text{cm}}{\text{sec}\,\frac{V}{\text{cm}}} = \text{cm}^2\,\text{sec}^{-1}\,\text{V}^{-1}$$

Distanţa reală parcursă de component este egală cu distanţa observată pînă la care a migrat el, plus distanţa pînă la care este împinsă o substanţă neîncărcată electric (dextran, creatinină) de către curentul de electroendosmoză.

Distanţa observată se determină coborînd o perpendiculară din vîrful liniei de precipitare (sau din vîrful curbei care integrează fracţiunea electroforetică) pe axa de migrare şi măsurînd distanţa dintre această perpendiculară şi orificiul în care s-a introdus substanţa analizată. Distanţa pînă la care este împins dextranul (sau creatinina) se adună la distanţa observată şi astfel se găseşte distanţa reală pînă la care ar fi trebuit să migreze componentul.

Proba care conţine dextranul (cca 1 mg, G. M. $< 100\,000$) se supune separării electroforetice pe o placă separată, în acelaşi timp şi în aceleaşi condiţii ca probele care conţin antigenul. Localizarea dextranului se face prin colorare cu iod. Se măsoară distanţa de la centrul spotului pînă la centru orificiului de migrare.

Dacă liniile de precipitare sînt nearcuite sau dacă sînt acoperite în zona centrală, se pot coborî perpendiculare din capetele liniilor. Se măsoară o „zonă" de mobilitate (14). Determinarea mobilităţii electroforetice prin măsurarea poziţiei liniilor de precipitare este o operaţie care ajută la identificarea unui antigen într-un amestec complex (16).

Scanned with OKEN Scanner

3. Numărul şi poziţia liniilor de precipitare (17)

Separarea imunoelectroforetică are o putere de rezoluţie superioară metodei electroforetice şi metodei de dublă difuziune din a căror contopire rezultă. Astfel ea poate distinge chiar acei componenţi care au *o mobilitate electroforetică identică*, deoarece, ca o consecinţă a specificităţii, imunoprecipitarea fiecărui component va forma linii de precipitare independente. Faţă de dubla difuziune, imunoelectroforeza are avantajul că împrăştie liniile de precipitare după mobilitatea lor electroforetică şi astfel poate distinge componente care au *o constantă de difuziune identică.*

Dacă două substanţe considerate diferite dau o singură linie de precipitare, înseamnă că constanta de difuziune şi mobilitatea lor electroforetică este identică, deci există bune şanse ca aceste două substanţe să fie identice. Deoarece poziţia liniilor de precipitare depinde şi de raportul concentraţiilor antigenului şi anticorpului (v. dubla difuziune), este posibil ca două substanţe cu *mobilitate electroforetică identică*, dar cu *constante de difuziune diferite* să formeze o singură linie de precipitare. În acest caz, coincidenţa liniilor se datoreşte faptului că componenta cu constanta de difuziune mai mare se găseşte într-o cantitate mai mică decît componenta cu constanta de difuziune mai mică. Astfel, viteza lor de difuziune va fi egală şi vor întîlni deodată frontul antiserului, formînd o singură linie de precipitare. Este evident că această situaţie se remediază variind proporţiile reactanţilor sau folosind un alt antiser.

Deoarece un antiser poate să nu conţină toţi anticorpii faţă de amestecul de antigen analizat, şi la imunoelectroforeză, ca şi la dubla difuziune, numărul de linii de precipitare trebuie considerat tot ca egal cu numărul minim de componente antigenice existente în amestec. Deoarece numărul de linii de precipitare dezvoltate variază de la un antiser la altul, nu se vor folosi niciodată amestecuri de antiseruri, ci analizele vor fi efectuate cu cîteva antiseruri de aceeaşi specificitate.

La numărul şi la localizarea liniilor de precipitare trebuie avut în vedere că unele substanţe (lizozim, fibrinogen, β-lipoproteină) au tendinţa să nu migreze normal şi de aceea să nu formeze linii de precipitare în zona aşteptată.

Interpretarea formei liniilor de precipitare, ca şi a raportului dintre liniile de precipitare învecinate trebuie făcută de pe poziţia datelor pe care le furnizează dubla difuziune în gel : forma şi poziţia liniilor de precipitare depind de raportul dintre constantele de difuziune şi de concentraţiile reactanţilor.

În mod obişnuit se întîlnesc următoarele cazuri :

Linie de precipitare curbată puternic, aşezată în apropierea axului de migrare. Este un semn că antigenul difuzează mult mai încet decît anticorpul. Difuziunea mai lentă a antigenului poate fi cauzată fie de greutatea sa moleculară mai mare decît a anticorpului, fie de concentraţia ei mai mică decît a anticorpului.Pentru un antigen dat, curbura liniei de precipitare va fi cu atît mai pronunţată, cu cît acesta se găseşte în cantitate mai mică sau cu cît anticorpul respectiv este mai abundent.

Scanned with OKEN Scanner

Linia de precipitare puţin curbată, orizontală, în apropierea şanţului cu antiser. Este un semn că antigenul difuzează mai rapid decît anticorpul şi poate fi interpretat invers ca mai sus. Pentru un antigen dat, linia de precipitare este cu atît mai apropiată de şanţul anticorpilor, cu cît el se găseşte în cantitate mai mare. Dacă anticorpul se găseşte în cantitate mică şi antigenul este foarte concentrat, arcul se formează în rezervorul anticorpilor sau chiar dincolo de acesta.

Linia de precipitare difuză, în partea opusă reactivului aflat în exces. Aspectul difuz al liniei de precipitare este cauzat de redizolvarea parţială a precipitatului în excesul de reactiv. Fenomenul este mai frecvent cînd se folosesc antiseruri de cal. Intensitatea liniei de precipitare nu este o măsură nici a cantităţii de antigen şi nici a cantităţii de anticorp specific, prezent în antiser. O apreciere cantitativă aproximativă se poate face numai efectuînd diluţii succesive ale antigenului şi notînd diluţia la care nu se mai formează linia de precipitare.

Linie de precipitare foarte alungită, aproape dreaptă. Acest aspect semnalează existenţa fie a unor componente cu o mobilitate electroforetică diferită, dar cu aceeaşi specificitate imunochimică, fie a unui singur component care lasă o trenă (este reţinut de agar). Pentru a deosebi aceste două situaţii se efectuează o electroforeză, se decupează o porţiune de gel din zona respectivă şi se aplică la o nouă imunoelectroforeză. Apariţia unei linii drepte este un semn că există un component cu trenă. Curbarea liniilor semnalează prezenţa unor componente cu mobilitate electroforetică diferită, dar cu specificitate imunochimică identică.

Linii de precipitare alăturate, duble sau triple cu capetele fuzionate. Este un caz particular care intervine în fenomenul de mai sus. Se consideră că există mai multe componente cu diferite mobilităţi electroforetice, dar serul imun nu poate detecta diferenţe în constituţia lor. În unele cazuri se poate corecta imaginea schimbînd serul imun. Liniile trebuie să-şi încrucişeze extremităţile, semn de neidentitate imunochimică (v. dubla difuziune) (fig. 77).

Linii de precipitare suprapuse. Dacă liniile sînt paralele şi se formează simultan este un semn că componentele au aceeaşi mobilitate electroforetică, dar o specificitate antigenică diferită (fig. 90 *a*). Acest caz trebuie diferenţiat de situaţiile în care *un singur component* poate da *două linii de precipitare suprapuse* dar cu capetele unite în exces de anticorp fig. 90,*b*) şi cu vîrfurile unite în exces de antigen (fig. 90, *c*). Unirea vîrfurilor în exces de antigen poate fi confundată uneori cu două linii independente, dar care se încrucişează într-o regiune apropiată de vîrful lor (fig. 90, *d*). Pentru a preciza în ce condiţii se găseşte, experimentatorul

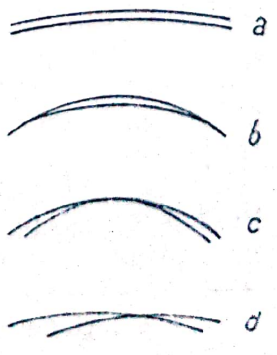


Fig. 90. — Diferite forme de linii de precipitare suprapuse. a, Două componente; b, un component, exces de anticorp; c, un component, exces de antigen; d, două componente.

trebuie să varieze raportul reactanţilor (se diluează antiserul şi (sau) se aplică la electroforeză mai puţin antigen). Dacă cele două linii se menţin, este o dovadă că sînt prezente două antigene distincte.

4. Identificarea antigenelor

Ca şi dubla difuziune, metoda imunoelectroforetică permite compararea unor amestecuri complexe de antigene ; ea stabileşte numărul de antigene specifice şi numărul de antigene comune. În plus, electroforeza permite izolarea din gelul de agar a unei cantităţi semnificative din antigenul studiat (v. p. 77) şi permite astfel o analiză imunochimică mai detaliată a acestuia.

Identificarea imunochimică a unui antigen într-un amestec complex se poate efectua numai cu condiţia ca acest antigen să fie în posesia experimentatorului în stare pură sau în compania unor impurităţi neantigenice. Există trei căi principale de identificare : tehnica şanţului scurtat (32) (20), tehnica şanţului întrerupt (16) şi tehnica şanţului suplimentar (25) (36) (16).

Tehnica şanţului scurtat (20). Se stabileşte în prealabil pînă în ce punct al plăcii migrează antigenul cercetat. Se efectuează o imunoelectroforeză şi se taie şanţul pentru anticorp pînă în dreptul locului unde se formează vîrful curburei liniei de precipitare. La aproximativ 1 cm distanţă se perforează un orificiu rotund în care se introduce antigenul de referinţă într-o *dilutie corespunzătoare* (aleasă prin experienţe prealabile de dublă difuziune). Se formează o linie de precipitare care fuzionează cu linia de precipitare corespunzătoare antigenului separat electroforetic, dacă cele două substanţe sînt identice (fig. 91).

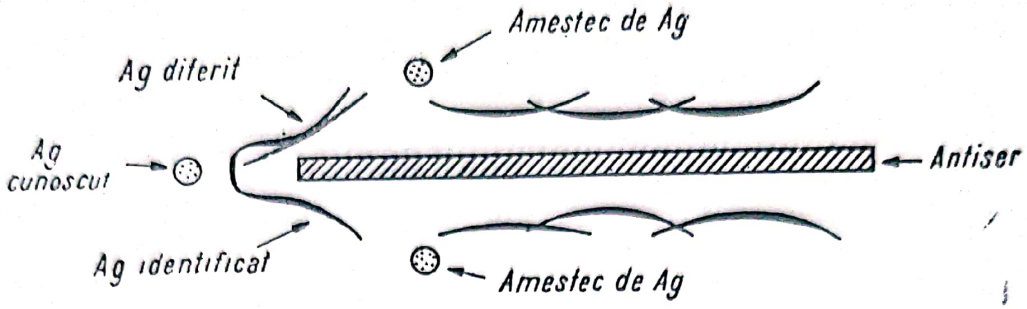
Dacă antigenul studiat are o linie de precipitare net delimitată de a celorlalte antigene cu care se găseşte în amestec, atunci se poate lăsa neschimbată lungimea şanţului şi să se aşeze antigenul de referinţă într-un orificiu apropiat de zona în care se etalează antigenul studiat (fig. 91, *b*). Dacă în orificiul suplimentar se aşază amestecul de antigene supus electroforezei, fuzionarea liniilor identifică într-o dublă difuziune Ochterlony linia de precipitare corespunzătoare antigenului separat electroforetic (fig. 91, *c*)[1].

Tehnica şanţului întrerupt (16). Această tehnică serveşte în special la compararea unor amestecuri de antigene în care se presupune că există unul sau mai mulţi componenţi comuni, dar experimentatorul nu dispune de nici unul din aceştia. Şanţul cu antiser se întrerupe în zona în care se presupune că există antigenele comune în cele două amestecuri (fig. 92 *a* şi *c*).

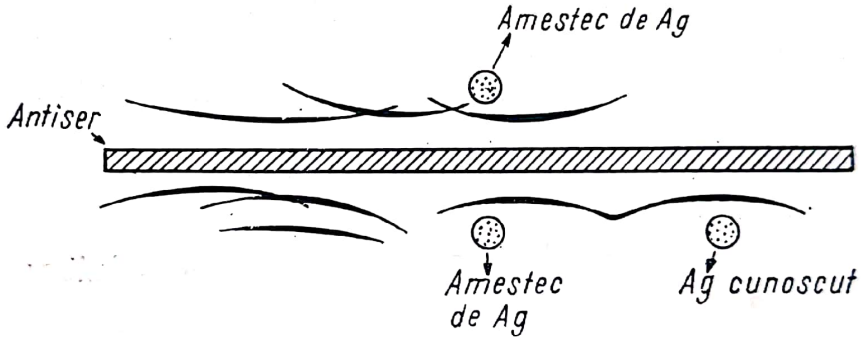
Liniile de precipitare se încovoaie în spaţiul întrerupt şi fuzionează sau se încrucişează după cum antigenele sînt sau nu identice. Distanţa şi poziţia exactă a întreruperii se tatonează în experienţe preliminare.

Această tehnică se poate folosi şi într-o variantă a şanţului scurtat. Şanţul se taie pînă în zona de etalare a antigenului comun astfel că liniile de precipitare se curbează în jurul capătului şanţului cu antiser. Dacă liniile

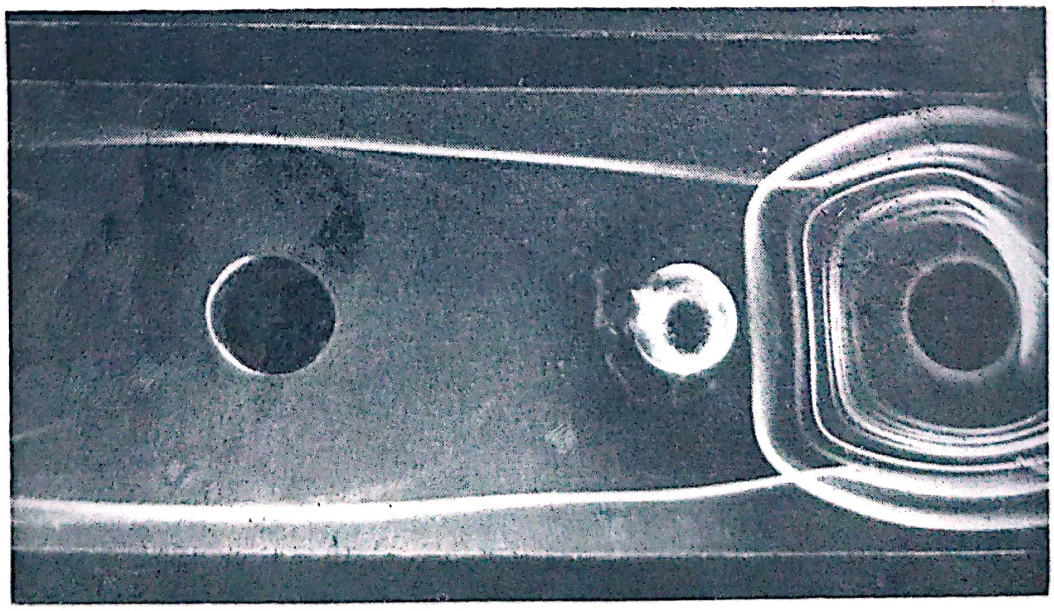
[1] Fotografie obţinută prin bunăvoinţa lui N. St. Chişiu.



a



b

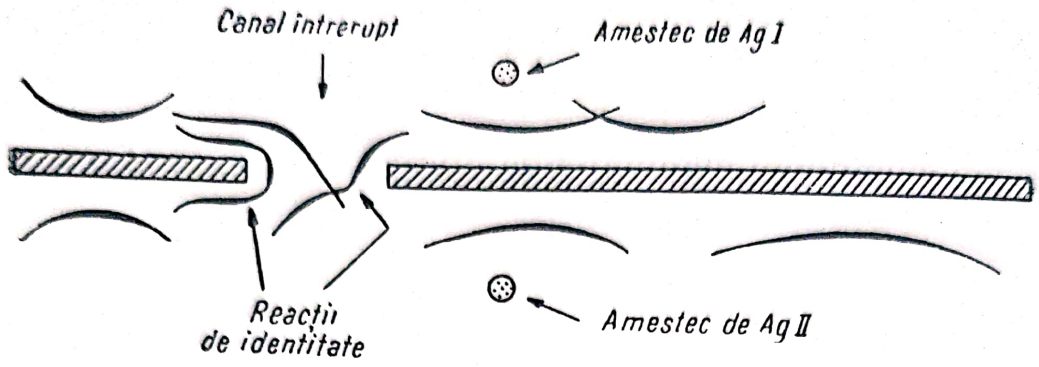


c

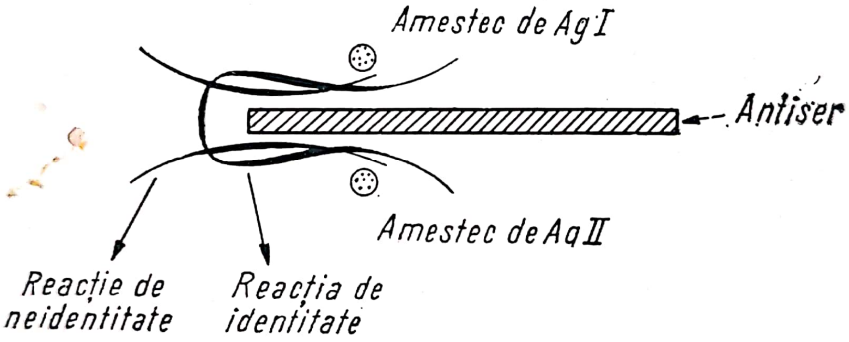
Fig. 91. — Variante ale tehnicii şanţului scurtat.

Scanned with OKEN Scanner

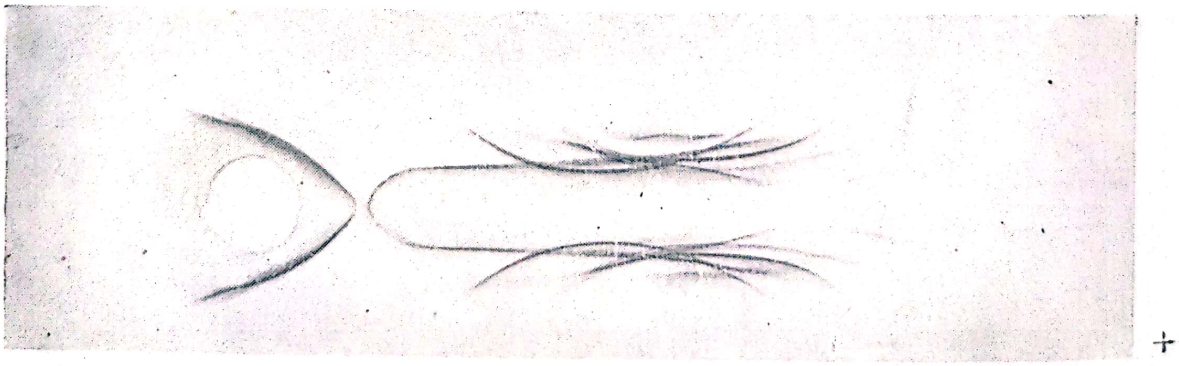
Scanned with OKEN Scanner



a

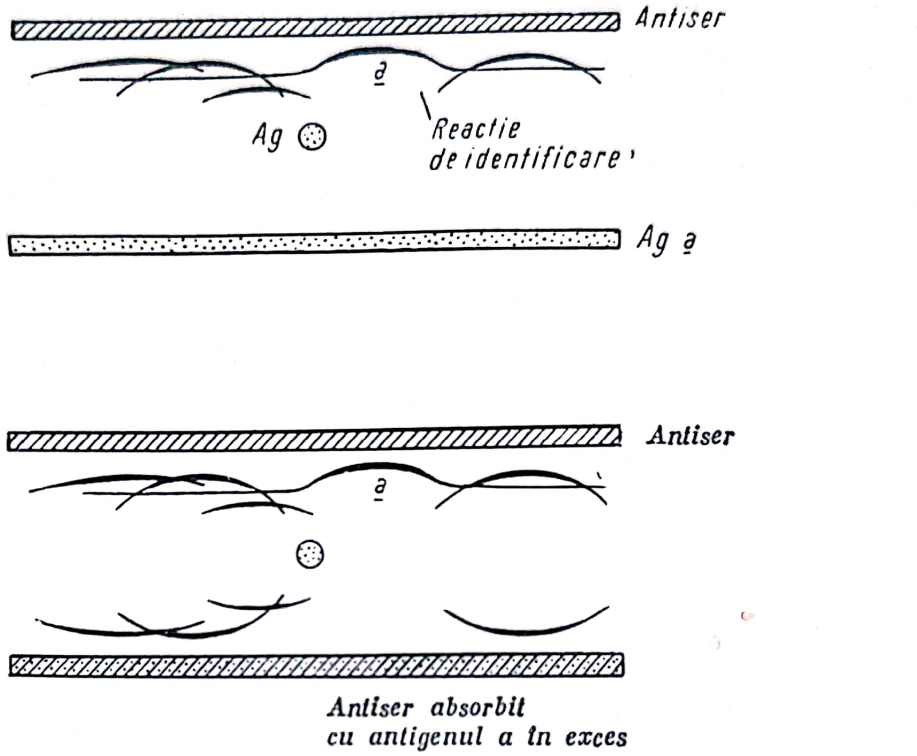


b



c

Fig. 92. — Variante ale tehnicii șanțului intrerupt.



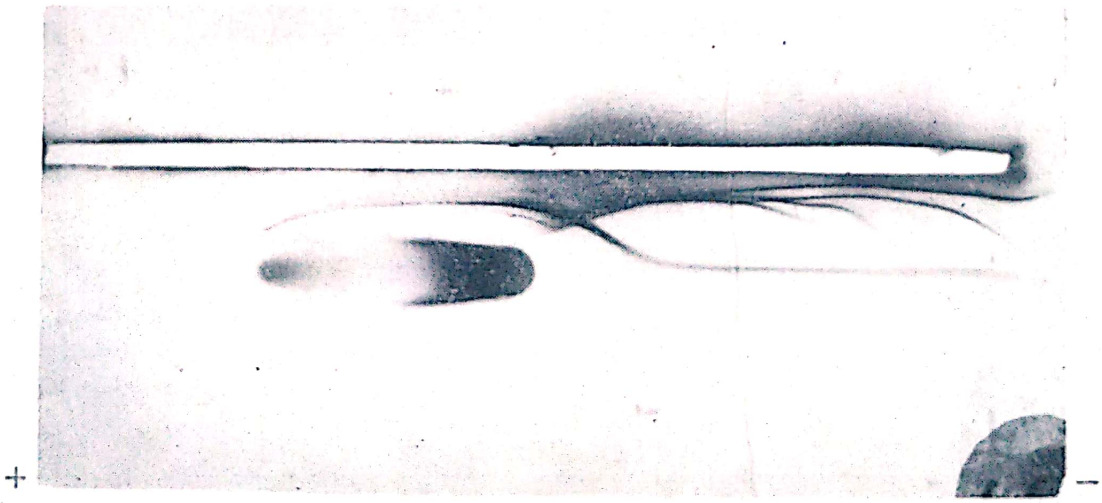


Fig. 93. — Variante ale tehnicii şanţului suplimentar.

se încrucişează, se formează o *coadă de rîndunică*, semn că antigenele nu sînt identice deşi au mobilităţi electroforetice asemănătoare. Dacă liniile fuzionează, se formează un contur în formă de U în jurul şanţului de antiser (fig. 92, *b*).

Tehnica şanţului suplimentar (25). După efectuarea electroforezei se taie, de o parte şi de alta a orificiului în care a fost introdus amestecul analizat, două şanţuri. În unul se introduce antiserul polivalent iar în celălalt antigenul pur. Întîlnirea dintre aceşti doi reactanţi va produce o linie lungă de precipitare, care va traversa toată lungimea plăcii şi se va racorda la arcul de precipitare corespunzător antigenului pur din amestec (fig. 93, *a* şi *c*).

Concentraţia antigenului introdus în şanţul suplimentar trebuie aleasă prin experienţe preliminare, efectuate prin dublă difuziune. Se va alege acea concentraţie a antigenelor care formează linia de precipitare cea mai net delimitată (echivalenţă).

Cu această tehnică se poate uneori demonstra prezenţa unor linii de precipitare care nu se observă prin tehnica imunoelectroforetică uzuală (36). Dacă în urma separării electroforetice un antigen X se găseşte în cantitate prea mică pentru a forma o linie de precipitare *vizibilă*, ea poate fi evidenţiată adăugînd în şanţul suplimentar amestecul iniţial care conţine antigenul X. Antigenul X, adăugat în şanţ, va difuza spre şanţul cu antiser, va creşte concentraţia antigenului X etalat în placă şi va determina apariţia unei linii de precipitare prelungită la capete.

În şanţul suplimentar poate fi introdus şi antiserul polivalent absorbit cu antigenul studiat, în mare exces (fig. 93, *b*). În acest caz, identificarea liniei de precipitare se va face prin constatarea *absenţei* ei de partea şanţului care conţine antiserul absorbit. Excesul de antigen liber va difuza spre şanţul care conţine antiserul neabsorbit şi va forma linia caracteristică, lungă şi dreaptă, care va fuziona cu extremităţile liniei de precipitare corespunzătoare antigenului studiat.

Alte tehnici. Identificarea unui antigen particular într-un amestec de antigene se poate face şi cu ajutorul unui antiser preparat faţă de acest antigen (antiser monospecific). De o parte a orificiului cu antigen se plasează şanţul cu antiserul polispecific, capabil să identifice toţi componenţii, iar de cealaltă parte şanţul cu antiserul monospecific. Prin compararea poziţiei relative a liniilor de precipitare se poate identifica antigenul. Dacă raporturile dintre concentraţia antigenului şi a antiserurilor este optimă, linia de precipitare dintre antiserul monospecific şi cel polispecific se poate uni (fig. 94).

În locul antiserului monospecific se poate utiliza şi antiserul polivalent, absorbit cu antigenul cercetat. În acest caz, identificarea antigenului

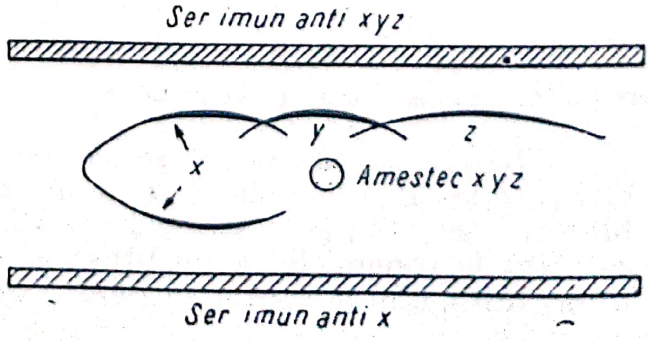


Fig. 94. — Identificarea antigenelor cu ajutorul antiserurilor specifice.

se face prin *absenţa* liniei de precipitare. Prezenţa antigenului în exces este tocmai situaţia întîlnită la tehnica şanţului suplimentar. Dacă formarea liniei lungi de racordare este nedorită, cele două şanţuri pot fi despărţite printr-un al treilea şanţ lăsat neumplut, care împiedică difuziunea antigenului aflat în exces spre antiserul neabsorbit. Această precauţie trebuie luată şi dacă se studiază un amestec de antigene, folosind două antiseruri capabile să reacţioneze unul cu celălalt.

5. Identificarea anticorpilor

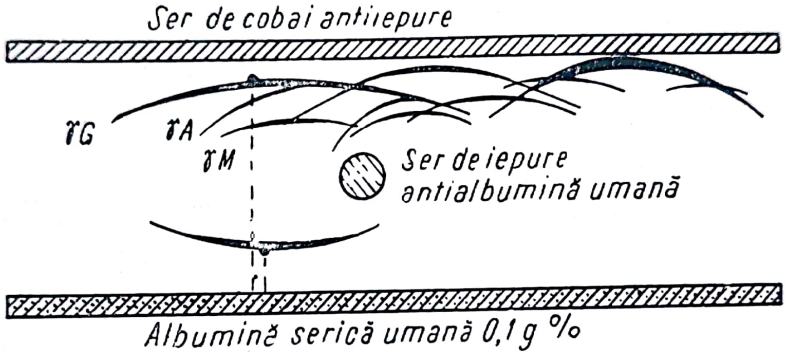
Identificarea clasei de imunoglobuline la care aparţin anticorpii dintr-un antiser dat se face printr-o operaţie inversă analizei imunoelectroforetice obişnuite : se migrează antiserul, iar în şanţuri, de o parte de şi alta a axei de migrare, se introduce antigenul şi un antiser capabil să reacţioneze cu serul imun analizat. Pentru a urmări mai uşor etapele analizei se presupune că trebuie aflată clasa de imunoglobuline la care aparţin anticorpii dintr-un ser imun de iepure antialbumină umană.

Se face electroforeza serului imun de iepure. De o parte a orificiului se taie un şanţ în care se introduce albumina serică umană într-o concentraţie adecvată (echivalenţă). Pe cealaltă parte a orificiului se taie un şanţ în care se introduce un ser imun de capră (sau de alt animal), capabil să reacţioneze cu proteinele serice de iepure (fig. 95, *a*). De partea şanţului cu antiserul de capră se formează un spectru obişnuit imunoelectroforetic, în care se identifică liniile caracteristice : γG-, γM- şi γA- globulinelor de iepure. De partea şanţului cu albumină se formează o singură linie de precipitare. Raportul dintre poziţia acestei linii de precipitare şi liniile de precipitare corespunzătoare γG-, γM- şi γA-globulinelor arată apartenenţa anticorpilor studiaţi la una din cele trei clase de imunoglobuline. La identificarea liniilor se va ţine seama mai mult de *mobilitatea lor electroforetică* şi mai puţin de distanţa dintre axul de migrare şi şanţ, la care se dispun liniile. În exemplul dat, anticorpii de iepure antialbumină umană aparţin clasei γG- globulinelor.

Diferenţierea γG- şi γM-globulinelor este uşurată dacă antiserul de iepure este tratat, înainte de electroforeză cu 2-mercaptoetanol. Dacă anticorpii sînt de tip γM, linia de precipitare dinspre şanţul cu antigen dispare.

6. Rezoluţie, sensibilitate şi artefacte

Metoda imunoelectroforetică are cea mai mare capacitate de rezoluţie dintre toate metodele de imunodifuziune, dar şi cea mai mică sensibilitate. Sensibilitatea şi rezoluţia metodei depind de toţi factorii care intervin în general în imunodifuzie şi care au fost analizaţi înainte, plus forma orificiului în care se introduce antigenul. Un orificiu rotund va con-



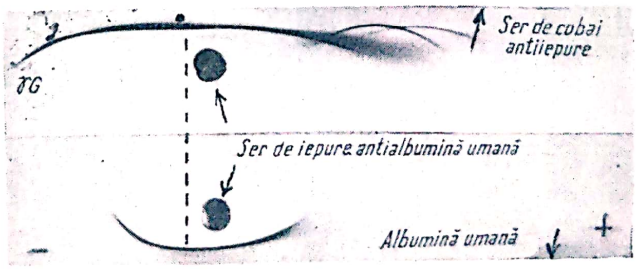


Fig. 95. — Identificarea anticorpilor dintr-un ser imun.

Scanned with OKEN Scanner

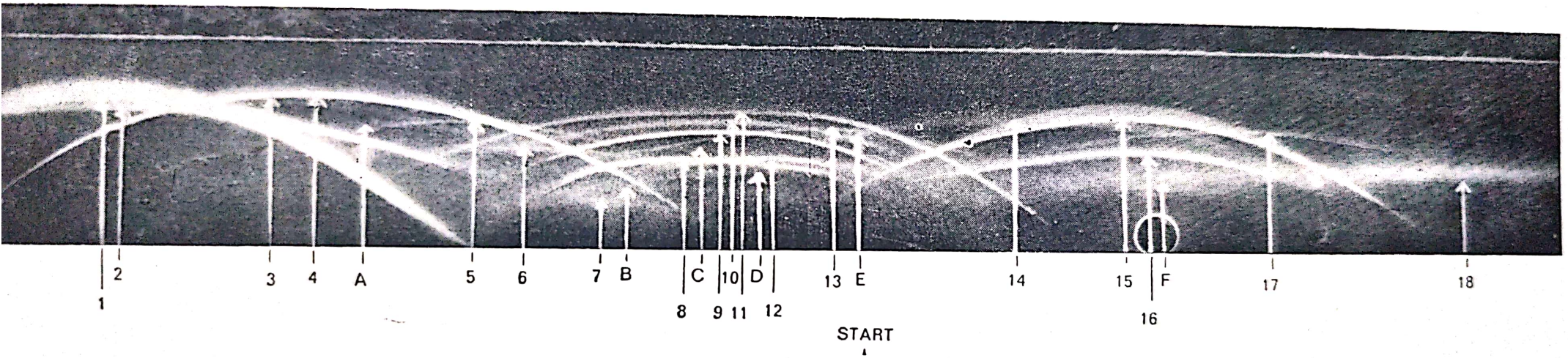


Fig. 96. — Imunoelectroforeza proteinelor din serul sanguin uman, relevate cu un antiser specific de cal (după J. Hirschfeld, 1962). Componenți vizibili în fotografie: 1, albumină; 2, α_1-lipoproteină; 3, α_1-seromucoid; 4, α_1-glicoproteină; 5, α_2-globulină I; 6, α_2-globulină III; 7, α_2-lipoproteină; 8, α_2-macroglobulină; 9, ceruloplasmină; 10, haptoglobină; 11, componenți specifici de grup; 12, α_2-globulină VI; 13, α_2-globulină V; 14, β_1-globulină legată de hemoglobină; 15, transferină; 16, β_1-globulină I; 17, γA-globulină; 18, γG-globulină. Locul unor componenți insuficient de bine relevați în fotografie: A, α_1-globulină I; B, α_2-globulină; C, α_2-globulină; D, α_2-globulină; E, α_2-globulină; F, β-lipoproteina.

Scanned with OKEN Scanner

ţine mai puţin antigen decît unul dreptunghiular, de aceea posibilitatea de a detecta un antigen aflat într-o cantitate foarte mică este mai mare dacă se foloseşte un orificiu dreptunghiular. În schimb, în acest caz, liniile de precipitare vor fi mai puţin curbe şi rezoluţia va fi mai slabă, deoarece liniile au tendinţa de a se încăleca. De asemenea pentru a putea distinge două linii de precipitare una de cealaltă este necesar ca vîrfurile lor să fie aşezate la o distanţă egală cu de două ori propria lor grosime. Orice operaţie care tinde să micşoreze această distanţă va scădea rezoluţia metodei, tot aşa cum întrebuinţarea unui antiser care permite formarea unor linii de precipitare subţiri va creşte rezoluţia metodei. Sensibilitatea metodei permite identificarea unor componenţi antigenici care se găsesc într-o cantitate chiar sub 0,1%. Concentraţia proteică a amestecului supus analizei trebuie să fie cît mai mare posibil tocmai pentru a putea evidenţia componente care se găsesc într-un procent relativ neînsemnat.

De aceea, lichidele biologice a căror concentraţie proteică variază între 4 şi 8 g% se introduc nediluate, iar dacă se prepară o soluţie pentru analiză este bine ca concentraţia ei proteică să nu fie sub 1 g%, mai ales dacă în ea există componente cu un procent relativ mic. Diluarea succesivă a antigenului determină o subţiere şi o scurtare corespunzătoare a liniei de precipitare pînă la dispariţia ei. Creşterea concentraţiei determină o îngroşare şi o lungire a liniei, care devine din ce în ce mai distinctă. Dacă cantitatea de antigen este excesivă, linia de precipitare poate să nu se formeze (în special cu antiseruri de cal).

În cursul analizei imunoelectroforetice pot apărea linii de precipitare false, ca rezultat al condiţiilor de lucru aplicate sau al reactivilor folosiţi. O astfel de linie de precipitare, datorită interacţiunii nespecifice dintre antiser şi antigenul analizat, este ilustrată în figura 81. La pH-uri sub 6,0 unele proteine serice pot precipita spontan, imitînd uneori o linie de precipitare autentică.

Artefacte apar şi în cursul spălării plăcilor, în special la începerea ei, cînd o parte din antigen sau din anticorp poate fi transportată în zone care conţin reactantul opus şi poate să determine apariţia unei noi linii de precipitare. Linia suplimentară se poate aşeza uneori în continuarea celei principale şi se formează o linie de precipitare cu o inflexiune, dînd impresia că este vorba de antigene cu aceeaşi specificitate imunochimică, dar cu mobilităţi electroforetice diferite.

Conservarea prelungită în condiţii necorespunzătoare sau uneori chiar la rece determină apariţia unor produşi de scindare enzimatică care alterează aspectul imunoelectroforegramelor. De aceea, folosirea unui antiser este limitată în timp chiar dacă se păstrează la rece şi în condiţii sterile sau antiseptice. La schimbarea antiserului trebuie să se facă experienţa de control pentru a se asigura reproductibilitatea experimentelor. Aceasta este de altfel şi principala deficienţă a analizei prin imunodifuzie : reactivul este un produs biologic care nu poate fi standardizat. De aceea pentru efectuarea experienţelor este necesară folosirea mai multor antiseruri de la indivizi diferiţi (din aceeaşi specie sau din specii diferite).

Scanned with OKEN Scanner

7. Imunoelectroforegrama proteinelor din serul sanguin

În serul sanguin s-au identificat pînă în prezent peste 75 de proteine, ditre care 15 au fost izolate în stare de înaltă puritate şi caracterizate din punct de vedere fizico-chimic. Aceste proteine, bine caracterizate, constituie aproximativ 96% din proteinele serice totale. Restul de 4% din conţinutul proteic total este alcătuit din cel puţin 60 de proteine, în special enzime, factori ai coagulării sîngelui şi hormoni proteici.

Analiza imunoelectroforetică a serului sanguin uman permite numărarea a mai mult de 20 de linii de precipitare, dacă se întrebuinţează un antiser puternic, de cal sau de iepure (fig. 96) (pentru liniile γA şi γM (v. fig. 64).

Distingem următoarele categorii principale de proteine :

În zona prealbuminică există două linii de precipitare, notate ρ_1 şi ρ_2. Uneori ρ_2 migrează în zona albuminei. Este o lipoproteină.

În zona albuminică, linia care apare prima este albumina. Din cauză că albumina se găseşte în exces de antigen, linia devine densă, difuză şi formează un arc care se extinde spre şanţul anticorpilor. În zona albuminei sau uneori precedînd-o se găseşte orosomucoidul, o glicoproteină acidă.

În zona α_1-globulinică, constituentul principal este o glicoproteină care este puternic antigenică şi care se găseşte sub forma unei linii bine conturate aproape în toate imunoelectroforegramele. Are acţiune antitriptică. Uneori este parţial acoperită de linia difuză de albumină. Tot în această zonă au mai fost identificate încă două linii de precipitare, una din ele chiar în interiorul liniei α_1-glicoproteinei.

În zona α_2-globulinică se pot număra un număr mare de linii de precipitare. Dintre acestea, patru sînt aproape paralele şi pot fi distinse numai după poziţia faţă de şanţul anticorpilor. În ordinea de la şanţ spre orificiu sînt : haptoglobina (1 sau 2 linii) ceruloplasmina, α_2- macroglobulina, α_2-lipoproteina. Pot fi diferenţiate prin colorаţii specifice.

În zona β_1-globulinică, proteina principală este siderofilina (transferina). Ea formează o linie bine curbată, apropiată de şanţul anticorpilor. Este una din liniile de precipitare cele mai caracteristice, care se identifică uşor. Tot în această zonă, sub linia siderofilinei, se găsesc două linii mai puţin curbate, cu o mobilitate ceva mai mare şi care uneori se încrucişează (β_{1A} şi β_{1B}- globulină). Mobilitatea acestor proteine depinde de vechimea serului analizat. β_{1A}-globulina este corelată cel puţin cu unul din componenţii complementului.

În zona β_2-globulinică, există două linii de precipitare care aparţin imunoglobulinelor. Linia corespunzătoare γA-globulinelor este dreaptă, alungită şi în bună parte acoperită de cea a γG-globulinelor. De multe ori ea apare ca o *coadă* în această zonă. Datorită aşezării ei în zona β_2-globulinelor este cunoscută şi sub numele β_2A-globulină (fig. 64).

Linia corespunzătoare γM-globulinelor este foarte subţire şi aşezată foarte departe de şanţul anticorpilor. În gelurile de agar obişnuite ea se întinde în spatele orificiului în care a fost depus serul analizat. Ea a fost numită şi β_{2M}-globulină.

Scanned with OKEN Scanner

În zona β_2 mai există şi alte linii β_{2B} şi β_{2C} a căror natură nu este încă pe deplin elucidată.

În zona γ-globulinică se observă o singură linie de precipitare care avansează în partea anodică a plăcii pînă în zona α_2-globulinelor. Este o linie caracteristică, aproape dreaptă, care se identifică uşor (ca şi albumina şi siderofilina).

Bibliografie

1. Antoine B., Science, 1962, **138**, 977.
2. Augustin R., Int. Arch. Allergy, 1957, **11**, 153.
3. Brishammar S., Hjerten S. a. Hofsten B., Biochim. Biophys. Acta, 1961, **53**, 521.
4. Consden R. a. Cohn J., Nature, 1959, **183**, 1 512.
5. Crowle A. J., Int. Arch. Allergy, 1960, **16**, 113.
6. — *Immunodiffusion*, Acad. Press, New York — Londra, 1961, 37—93.
7. Darcy D. A., Immunology, 1960, **3**, 225.
8. Fahey J. L. a. Mc Kelevy E. M., J. Immunol., 1965, **94**, 84.
9. Feinberg J., Int. Arch. Allergy, 1957, **1**, 129.
10. Gheţie V., St. şi cerc. biochim., 1961, **4**, 397.
11. Gheţie V. şi Moţet-Grigoraş D., St. şi cerc. biochim., 1962, **5**, 409.
12. — St. şi cerc. biochim., 1965, **4**, 337.
13. Grabar P., in Glick D., *Methods of Biochemical Analysis*, Intersci., New York, 1959, **VII**, 1.
14. — in Ackroyd J. F. A., *Immunological Methods*, Blackwell, Oxford. 1964, 79.
15. Grabar P. a. Burtin P., *Immunoelectrophoretic analysis*, Elsevier, Amsterdam — Londra — New York, 1964, 3—94.
16. Heremans J., *Les globulines sériques du système gamma*, Arscia — Masson, Bruxelles-Paris, 1961, **34**, 42.
17. Hirschfeld J., Nature, 1960, **185**, 164.
18. — Science Tools, 1962, **8**, 17.
19. Kabat E. A. a. Mayer M. M., *Experimental Immunochemistry*, Thomas, Springfield, 1961, 88.
20. Levy B. et Polonovski J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, **40**, 1 293.
21. Mancini G., Carbonara A. O. a. Heremans J. F., Immunochem., 1965, **235**, 2.
22. Nace G. W. a. Alley J. W., J. Biol. Phot. Assoc., 1961, **29**, 125.
23. Oakley C. L. a. Fulhrope R., J. Path. Bact., 1953, **65**, 49.
24. Orlans E., Rose M. E. a. Marrack J. R., Immunology, 1961, **5**, 262.
25. Osserman E. F., J. Immunol., 1960, **84**, 93.
26. Ouchterlony O., Prog. in Allergy, 1958, **1**, 5.
27 — in Ackroyd J. F. A., *Immunological Methods*, Blackwell, Oxford, 1964, 55.
28. Oudin J., in Corcoran A., *Methods in Medical Research*, Yearbook, Chicago, 1952, **V**, 335.
29. Peer J. R., J. Immunol., 1956, **77**, 52.
30. Poulik M., J. Immunol., 1959, **82**, 481.
31. Scheidegger J. J., Int. Arch. Allergy, 1955, **7**, 103.
32. Schultze H. E., Schönenberger M. u. Schwick G., Biochem. Z., 1956, **328**, 267.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL AL XI-LEA. IMUNOFLUORESCENŢA

I. PRINCIPIUL METODEI

În principiu, o reacţie de precipitare se poate efectua şi în celule. Aplicînd pe un preparat microscopic o soluţie de anticorpi, aceştia vor reacţiona cu antigenele corespunzătoare din celule, dînd naştere unui microprecipitat. După localizarea microprecipitatului se pot trage concluzii în legătură cu distribuţia intercelulară sau intracelulară a antigenului. Din păcate, o soluţie obişnuită de anticorpi nu se poate pune în evidenţă microprecipitatul, deoarece el nu are proprietăţi optice detectabile microscopic. Dacă însă de moleculele anticorpilor se ataşează o substanţă fluorescentă, atunci microprecipitatul va manifesta o fluorescenţă caracteristică în lumina ultravioletă. După distribuţia fluorescenţei în celule, experimentatorul poate trage concluzii valabile în legătură cu localizarea antigenului studiat.

Imunoprecipitarea cu anticorpi fluorescenţi se efectuează după următoarea schemă generală: se obţin secţiuni microscopice din ţesutul în care se urmăreşte distribuţia unui antigen oarecare. Peste secţiunile montate pe o lamă microscopică se picură o soluţie de anticorpi fluorescenţi. După un anumit timp de contact, în care a avut loc reacţia dintre anticorpi şi antigenul corespunzător, se îndepărtează excesul din soluţia de anticorp. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescenţă.

Metoda anticorpilor fluorescenţi a fost concepută de către A. Coons între anii 1942 şi 1950 (6). Destinată iniţial localizării antigenelor în ţesuturi şi celule, această metodă a cunoscut o atît de largă dezvoltare încît în prezent se aplică şi la detectarea anticorpilor specifici.

Detectarea antigenelor specifice se poate realiza printr-un procedeu direct şi unul indirect.

Procedeul direct constă în aplicarea anticorpilor fluorescenţi peste preparatul microscopic care conţine antigenul studiat (19) (fig. 97, *a*).

Procedeul indirect, denumit şi tehnica straturilor multiple, este constituit din două etape. În prima etapă se tratează preparatul microscopic cu anticorpul specific nemarcat (fig. 97, *b*). Imunoprecipitatul format este făcut vizibil în etapa a doua, adăugînd un anticorp fluorescent, preparat faţă de anticorpul specific nemarcat (fig. 97 *c*). Cum anticorpul nefluorescent specific are caracterul imunochimic al γ-globulinei, în etapa a doua se foloseşte de fapt un anticorp fluorescent anti-γ-globulinic.

Identificarea anticorpilor specifici sintetizaţi în celule. Este posibil numai procedeul indirect. În prima etapă secţiunea se tratează cu o so-

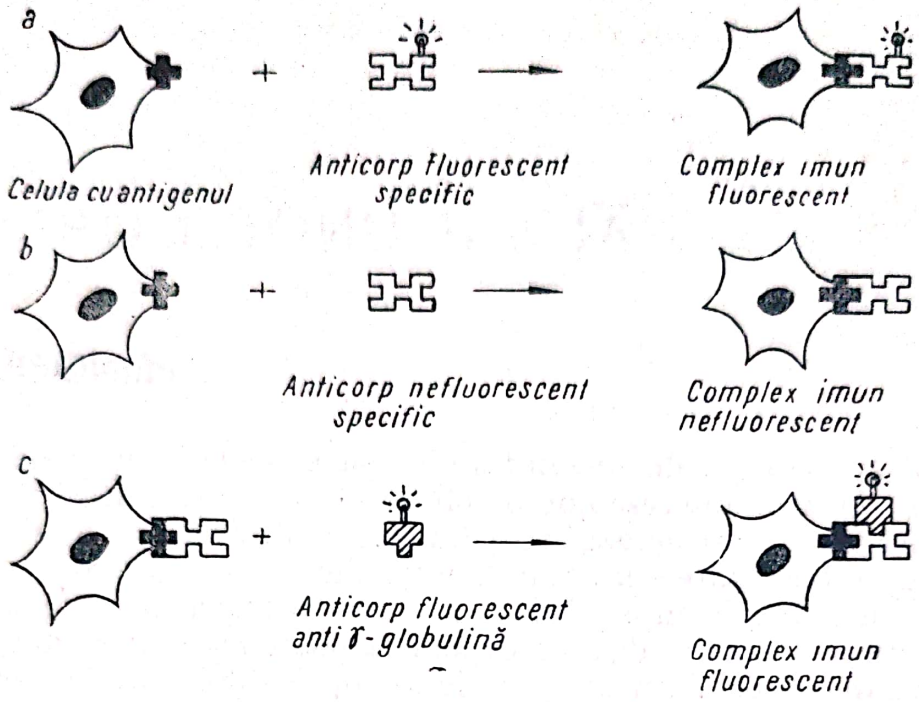


Fig. 97. — Detectarea antigenelor specifice prin coloraţie imunofluorescentă (adaptat după R. C. Mellors, 1959). a, Procedeul colorării directe; b, c, etape în procedeul colorării indirecte.

luţie a antigenului specific, nemarcat (fig. 98, *a*). Complexul format se pune în evidenţă tratînd secţiunea cu anticorpi fluorescenţi obţinuţi faţă de antigenul care a intrat parţial în combinaţie cu anticorpii intracelulari (fig. 98, b).

Imunoprecipitarea cu anticorpi fluorescenţi are două însuşiri fundamentale: *specificitatea*, derivată din caracterul imunologic al experimentului, şi *sensibilitatea*, tipică metodelor bazate pe fluorescenţă.

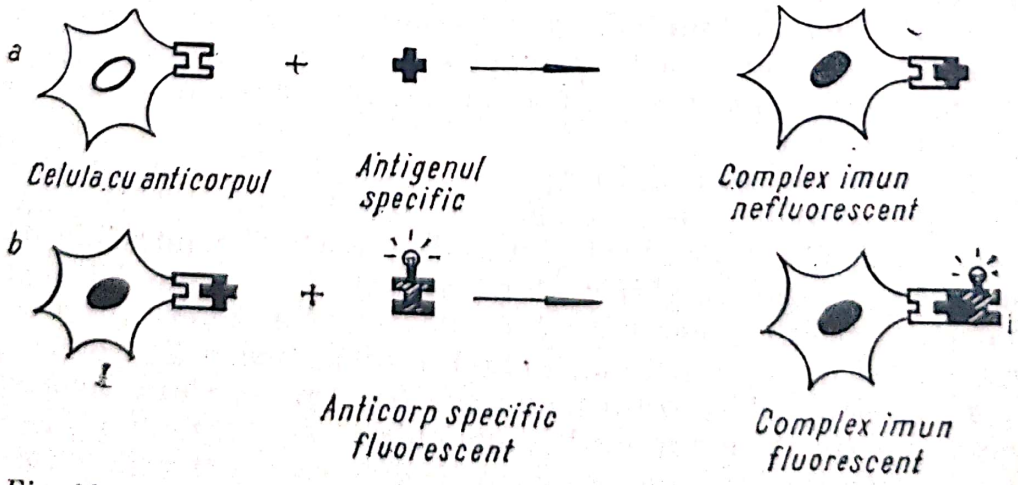


Fig. 98. — Detectarea anticorpilor specifici prin coloraţie imunofluorescentă (după R. C. Mellors, 1959). a şi b, Etapele colorării.

II. SUBSTANŢE FLUORESCENTE UTILIZATE LA MARCARE

Substanţele fluorescente absorb lumina incidentă de diferite lungimi de undă şi o convertesc într-o lumină vizibilă, cu o lungime de undă mai lungă. Mulţi compuşi fluorescenţi sînt excitaţi prin lumina invizibilă în regiunea ultravioletă şi emit o lumină vizibilă, cu o lungime de undă mai mare.

Coloranţii fluorescenţi sînt cunoscuţi în histochimie sub denumirea de fluorocromi. Nu orice fluorocrom poate fi întrebuinţat la marcarea anticorpilor. Pentru aceasta el trebuie să îndeplinească următoarele condiţii :

a) Să aibă un randament al fluorescenţei mare, pentru a asigura sensibilitatea reacţiei.

b) Lumina emisă să se situeze într-o regiune a spectrului vizibil cît mai apropiată de cea a maximei sensibilităţi a ochiului.

c) Deoarece ţesuturile au o fluorescenţă proprie (autofluorescenţă), fluorocromul folosit trebuie să prezinte o fluorescenţă cît mai diferită de cea a ţesutului cercetat.

d) Să posede o grupare funcţională prin mijlocirea căreia să se poată fixa solid de molecula anticorpului.

e) Să fie solubilă în soluţii apoase, deoarece solvenţii organici pot cauza, la cuplare, denaturarea proteinei.

f) Să nu-şi piardă fluorescenţa prin conjugare cu proteinele.

g) Să se poată cupla cu anticorpii, fără a le altera specificitatea sau activitatea (titrul).

h) Conjugatele să nu-şi piardă fluorescenţa prin iluminare mai lungă.

În afară de aceste condiţii, trebuie avut în vedere şi faptul că fluorescenţa este uşor modificată prin variaţii de pH sau prin cantităţi neînsemnate de săruri ale unor metale grele.

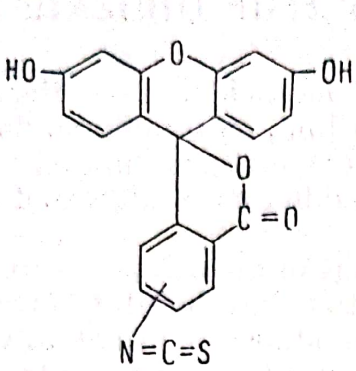
Din numărul mare de fluorocromi propuşi pentru conjugare cu anticorpii, numai cîţiva îndeplinesc majoritatea cerinţelor formulate mai sus. Aceştia aparţin la două clase de substanţe : combinaţii cu funcţiunea izocianat sau izotiocianat şi combinaţii cu funcţiunea sulfoclorură.

1. Izocianaţii şi izotiocianaţii (28)

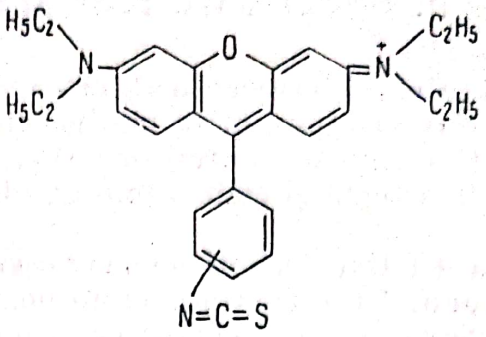
Izotiocianatul de fluoresceină este o pulbere galbenă-portocalie, stabilă în stare uscată. Superioritatea izotiocianatului de fluoresceină faţă de izocianat constă nu numai în preparare mai uşoară şi conservare mai bună, ci şi în fluorescenţa de patru ori mai intensă a conjugatelor sale. În plus izotiocianatul poate fi cuplat cu anticorpii direct, sub formă de pulbere, în timp ce izocianatul nu se pretează conjugării decît în soluţie de acetonă sau dioxan.

Un alt izotiocianat folosit la marcarea anticorpilor derivă de la rodamina B.

Scanned with OKEN Scanner



Izotiocianatul de fluoresceină

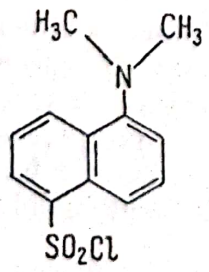


Izotiocianatul de rodamină B

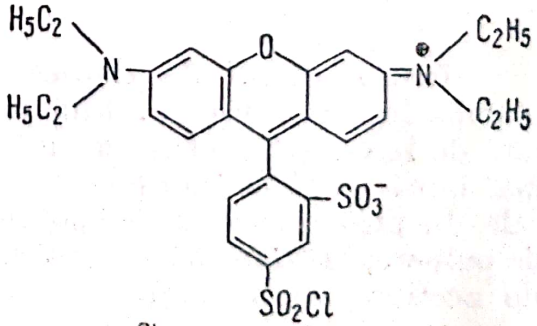
Izotiocianatul de rodamină B şi cel de fluoresceină sînt cei mai recomandabili fluorocromi pentru metoda anticorpilor fluorescenţi. Fluoresceina are o fluorescenţă galbenă-verde, iar rodamina B are o fluorescenţă roşie-portocalie. Deşi ambele substanţe au un randament al fluorescenţei apropiat (75—80%), totuşi fluoresceina prezintă avantajul că pentru aceeaşi intensitate a fluorescenţei, ochiul este mai sensibil la culoarea galbenă-verde decît la cea roşie-portocalie. În schimb, autofluorescenţa albastră-verzuie a ţesuturilor este mai des întîlnită la animale decît cea roşie-portocalie, de aceea derivaţii rodaminei B oferă un contrast al culorii mai bun (2).

2. Clorurile de sulfonil

Sînt cunoscuţi în prezent numeroşi fluorocromi de acest tip, însă dintre aceştia numai clorura acidului 1-dimetil-aminonaftalen-5-sulfonic (clorura de Dansil) (35) şi clorura de sulfonil a lizaminei-rodaminei B 200 (RB 200) (21) întrunesc calităţile cerute unui bun agent de marcare.



Clorura acidului 1-dimetil-aminonaftalen-5-sulfonic



Clorura de sulfonila lizaminei-rodaminei B 200

Scanned with OKEN Scanner

III. CUPLAREA ANTICORPILOR CU SUBSTANȚELE FLUORESCENTE

Dacă pentru cuplare se întrebuințează antiserurile ca atare, atunci fluorocromii se pot lega nu numai de proteinele-anticorpi, ci și de celelalte fracțiuni proteice ale serului. Capacitatea proteinelor fluorescente, imunologic inactive, de a se combina cu proteinele celulare din preparatul microscopic, provoacă colorația nespecifică a acestor preparate, ceea ce perturbă experiențele. De aceea, este recomandabil ca în locul antiserurilor totale fluorescente să se folosească preparate de anticorpi fluorescenți, eliberate de celelalte fracțiuni proteice ale serului. Există două soluții pentru îndeplinirea acestei cerințe:

a) Cuplarea fluorocromului cu antiserul integral și separarea ulterioară a anticorpilor fluorescenți prin metodele obișnuite de fracționare. Se realizează astfel și purificarea concomitentă a conjugatelor, deoarece prin aceste operații se îndepărtează atît excesul de fluorocrom nereacționat, cît și celelalte componente ale serului.

b) Aplicarea metodelor de fracționare înainte de conjugare. În acest fel se supun cuplării preparate care conțin practic toate proteinele anticorpi (γ-globuline). Conjugatele astfel obținute trebuie purificate numai de excesul de fluorocrom nereacționat. Aceasta este metoda care furnizează cele mai bune rezultate.

1. Cuplarea cu izotiocianați (18)

Izotiocianații reacționează cu grupările aminice libere ale proteinelor, formînd o legătură tiocarbamidică:

$$Fl - N = C = S + H_2N - Ac \rightarrow Fl - NH - \overset{\overset{S}{\|}}{C} - NH - Ac$$

În aceste reacții sînt interesate în special grupările ε-amino ale lizinei.

Tehnica de lucru (15). Se izolează anticorpii din antiser prin precipitare cu sulfat de amoniu la o concentrație de 33%, urmată de cromatografie pe DEAE—celuloză (v. cap. VIII/I). Cu preparatul obținut se face o soluție cu o concentrație proteică de 1—2 g% în tampon carbonat-bicarbonat pH = 9,0, μ = 0,05 M[1]. Se pot folosi și alte tampoane cu același pH și molaritate ca: fosfat, TRIS-HCl, veronal sodic, borat (15). Se răcește soluția în gheață (4°C) și se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, izotiocianatul suspendat într-un volum de tampon carbonat de 10 ori mai mic decît cel al soluției proteice. Suspensia se prepară mojarînd izotiocianatul și adăugînd treptat tamponul pînă la volumul dorit. Cantitatea de izotiocianat care se

[1] Se amestecă 4 părți Na_2CO_3 0,05 M cu 1 parte $NaHCO_3$ 0,05 M și se ajustează pH-ul la 9,0 cu HCl concentrat.

Scanned with OKEN Scanner

adaugă variază între 0,02 şi 0,05 mg/mg de proteină. El trebuie să se dizolve complet în soluţia proteică supusă fluorocromării. După adăugarea izotiocianatului soluţia se mai agită 15 min. Se controlează pH-ul soluţiei şi dacă se constată că a scăzut sub 8,7 se aduce la valoarea iniţială cu NaOH 0,1 N (36). Se introduce soluţia într-un vas care se închide etanş şi se ţine la frigider 16—24 de ore. A doua zi, soluţia fluorescentă este gata pentru purificare.

Fluorocromarea poate fi efectuată şi la temperatura camerei, folosind un timp de conjugare de 2—4 ore, fără a altera proprietăţile imunologice ale preparatului.

2. Cuplarea cu sulfoclorurile

Clorurile de sulfonil reacţionează cu grupările aminice libere ale proteinelor, formînd o legătură stabilă, sulfonamidică :

$$Fl - SO_2Cl + H_2N - Ac \rightarrow Fl - SO_2 - NH - Ac$$

Pot fi interesate în această reacţie α - aminogrupările unor aminoacizi, ε -aminogrupările lizinei, grupări aminice secundare şi chiar grupări oxidril ale proteinelor. Legătura sulfonamidică este mai stabilă decît cea tiocarbamidică şi mai puţin susceptibilă de a fi desfăcută de enzimele care se găsesc în ţesuturi (21).

Tehnica de lucru. Se prepară o soluţie de anticorpi de 1—3 g% (26) în tampon carbonat-bicarbonat pH = 9,0, 0,05—0,1 M.

Fluorocromul se introduce în această soluţie, prins pe celită (30). Se adaugă între 0,02 şi 0,04 mg de fluorocrom/mg proteină din soluţie. Deoarece celita conţine de obicei 5% fluorocrom se va adăuga între 0,4 şi 0,8 mg de celită fluorescentă/mg proteină. Clorurile de sulfonil se folosesc sub această formă deoarece sînt practic insolubile în apă şi numai pe această cale pot fi dispersate în soluţia proteică.

Adăugarea pulberei fluorescente se face în porţiuni mici, agitînd continuu soluţia. Se continuă agitarea încă 30 min, după care cuplarea este terminată. Se centrifughează soluţia la 3 000—5 000 g timp de 10—15 min pentru îndepărtarea celitei şi soluţia este gata pentru purificare.

3. Proprietăţile conjugatelor

Spectrul de *absorbţie* al conjugatelor prezintă maxime care depind de natura fluorocromului : 575 mμ pentru rodamină-lizamină, 495 mμ pentru fluoresceină şi 340 mμ pentru dimetilaminonaftalen.

Spectrul de *emisie* al conjugatelor prezintă două maxime pentru rodamină-lizamină, la 595 mμ şi 710 mμ, pentru fluoresceină variază în jurul valorii 520 mμ, iar pentru dimetilaminonaftalen se întinde între 450 şi 620 mμ cu un maxim la 525 mμ.

Concentraţia proteică a conjugatelor la care se mai observă fluorescenţa, dacă se iluminează cu o lumină ultravioletă, este cuprinsă între 0,25 şi 0,50 μg/ml pentru fluorocromii uzuali.

Scanned with OKEN Scanner

Măsurarea gradului de conjugare, adică a raportului dintre cantitatea de fluorocrom şi proteina din conjugat, se efectuează pe preparate purificate. Determinările se bazează pe faptul că maximele de absorbţie ale proteinei şi fluorocromului sînt suficient de îndepărtate pentru a nu se stînjeni reciproc. Astfel, pentru proteine concentraţia se determină la 280 mμ (spectrofotometric), iar pentru fluorocrom la lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbţie. Dacă se folosesc curbe etalon şi se exprimă valorile găsite în moli, se poate calcula numărul mediu de molecule de fluorocrom care se fixează într-o moleculă de anticorp (21).

Dacă se cuplează prea puţin fluorocrom, atunci conjugatul nu emite suficientă lumină pentru a putea fi uşor observat. Dacă se ataşază prea mult fluorocrom, culoarea este strălucitoare, dar anticorpii se vor ataşa şi în locuri unde nu există antigenul corespondent (coloraţie nespecifică). Între aceste două extreme există un interval în care anticorpul fixează cantitatea optimă, pentru a permite o coloraţie luminoasă şi specifică. Prepararea unor astfel de anticorpi depinde de condiţiile de fluorocromare şi mai ales de felul în care se purifică conjugatul.

4. Fluorocromarea directă a antiserurilor

În cazuri *excepţionale,* cînd experimentatorul nu dispune decît de cantităţi mici de antiser, se va putea face marcarea directă a anticorpilor fără purificarea lor prealabilă. Pentru fluorocromare nu se vor folosi decît izotiocianaţii, deoarece clorurile de sulfonil sînt captate de albumină (32).

Se procedează astfel : se diluează antiserul 1 :2 cu tampon-carbonat, pH 9,0,0,2 M. La antiserul diluat se adaugă sub formă de pulbere izotiocianatul, în porţiuni foarte mici şi agitînd continuu. Se va aştepta de fiecare dată dizolvarea completă a substanţei. Soluţia fluorescentă se lasă în repaus, la temperatura camerei, 2—4 ore, şi apoi se purifică prin filtrare pe gel sau cromatografie pe coloană.

IV. PURIFICAREA CONJUGATELOR

Preparatele brute de anticorpi fluorescenţi nu pot fi întrebuinţate în analiză decît după o purificare prealabilă. Purificarea urmăreşte reducerea la minimum a coloraţiei nespecifice, obstacol principal în interpretarea justă a coloraţiilor imunofluorescente.

Coloraţia nespecifică apare ca rezultat al interacţiunii dintre substanţele de balast conţinute în antiserurile fluorescente nepurificate şi unii componenţi normali ai ţesuturilor animale studiate. Aceste substanţe de balast sînt alcătuite din :

a) Substanţa fluorescentă nereacţionată cu proteina în timpul cuplării. Materialul fluorescent nereacţionat se găseşte în preparatele brute, atît sub formă liberă, cît şi sub formă adsorbită de proteinele din soluţie.

b) Proteine imunologic inactive, cuplate cu substanţa fluorescentă folosită la marcare. Astfel de conjugate se formează în cazul cuplării anti-

serurilor integrale, în care alături de anticorpi se găsesc şi celelalte componente proteice normale ale serului (albumină, α-şi β-globuline). Cum aceste fracţiuni proteice pot reacţiona nespecific cu componente tisulare formînd combinaţii stabile (34) (20), este evident că prezenţa lor în antiserurile fluorescente poate determina colorarea nespecifică a preparatului microscopic obţinut din ţesutul studiat. Folosind la cuplare soluţii purificate de anticorpi şi nu antiser integral, preparatele nu conţin conjugate imunologic inactive, capabile de coloraţie nespecifică.

c) Substanţe fluorescente legate de alte γ-globuline-anticorpi decît anticorpii care interesează pe experimentator. Aceşti anticorpi apar în antiseruri ca rezultat al imunizării animalelor cu antigene impure. Eliminarea anticorpilor nedoriţi se efectuează prin absorbţia preparatelor cu materialul antigenic care impurifică antigenul folosit la imunizare.

1. Metode de purificare

Metodele de purificare a conjugatelor fluorescente urmăresc îndepărtarea substanţelor de balast care determină coloraţia nespecifică. Purificarea conjugatelor poate fi efectuată prin mai multe procedee : dializă şi precipitare, extracţie cu acetat de etil (10), absorbţie cu cărbune activat (21), filtrare pe gel de Sephadex (9) (14), cromatografie pe schimbători de ioni (9) (17) (11) şi absorbţie cu pulbere de ţesut.

Dintre aceste metode, o atenţie specială trebuie acordată cromatografiei pe DEAE-celuloză. Ea permite nu numai îndepărtarea materialului fluorescent nereacţionat, dar şi separarea anticorpilor după cantitatea de fluorocromi pe care au fixat-o (17) (11) (3).

Este cunoscut că prin cuplare pH-ul izoelectric al γ-globulinei este cu atît mai scăzut, cu cît proteina a fixat mai multe molecule de fluorocrom. Cum în soluţie există molecule de γ-globuline care au fixat cantităţi diferite de fluorocrom, ele vor avea pH-uri izoelectrice diferite şi vor putea fi separate prin cromatografie pe DEAE-celuloză. Dacă eluţia se începe cu tampon-fosfat pH 7,5-8,0, 0,01 M şi apoi se aplică un gradient de fosfat (pînă la 0,3 M) sau de NaCl (de la 0,04 la 1 M) se vor putea elua fracţiuni proteice diferite, care conţin, în general, cantităţi din ce în ce mai mari de fluorocrom (fig. 99).

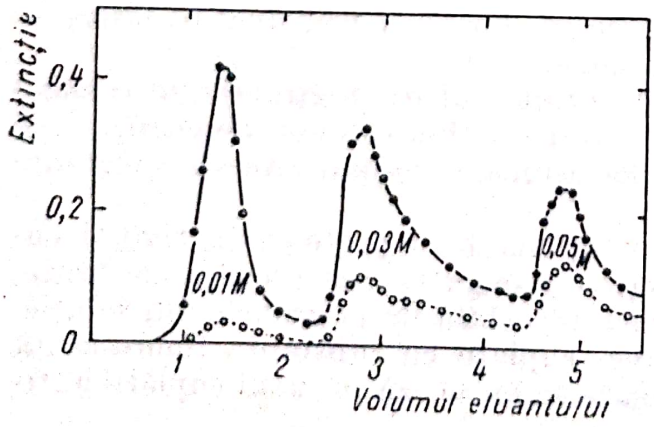


Fig. 99. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a anticorpilor γG de iepure marcaţi cu izotiocianat de fluoresceină (după B. T. Wood şi colab., 1965). Linia continuă : absorbţie la 280 mμ ; linia întreruptă : absorbţie la 470 mμ (cifrele reprezintă molarităţile crescătoare ale tamponului fosfat utilizat, pH 7,5).

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece fracţiunile proteice care leagă o cantitate prea mică de fluorocrom nu dau o coloraţie suficient de luminoasă, iar cele cu prea mult fluorocrom dau reacţii nespecifice, se poate alege acea fracţiune cromatografică care dă coloraţie optimă (coloraţie nespecifică neglijabilă şi luminozitate satisfăcătoare).

Filtrarea prin gel de Sephadex (9) (14)

Filtrînd soluţia fluorescentă peste o coloană umplută cu gel de Sephadex G-25 sau G-50, se îndepărtează materialul fluorescent nereacţionat într-un timp scurt, cu pierderi neînsemnate din proteina imunologic activă (1—10%) (13).

Se umple o coloană cu Sephadex suspendat în soluţie salină tamponată cu 0,01 M fosfat la pH 7,0 şi se lasă să se depună sub forţa gravitaţiei. După umplerea coloanei se lasă ca lichidul să scadă pînă la suprafaţa gelului şi se adaugă soluţia fluorescentă. Cînd ultima porţiune a probei a intrat în gel, se spală suprafaţa cu o cantitate mică de eluant (tot soluţie salină tamponată), urmată de o cantitate mai mare pentru pornirea eluţiei.

Volumul soluţiei fluorescente supus filtrării depinde de dimensiunile coloanei. Astfel, printr-o coloană de 2×10 cm se pot filtra 2 ml din soluţia fluorescentă, în timp de 30 min, la temperatura camerei. Migrarea conjugatului se poate urmări iluminînd coloana cu o lampă de raze ultraviolete. Se observă separarea a două zone fluorescente. Una mai îngustă, care migrează rapid, conţine complexul proteină-fluorocrom. Cealaltă zonă, mai difuză, rămîne în partea superioară a coloanei şi conţine fluorocromul liber. Se colectează fracţiunea care conţine conjugatul într-un volum de eluant de 2—3 ori mai mare decît cel iniţial. Această diluare, inerentă tehnicii, poate fi remediată prin dializă de concentrare, care aduce soluţia la volumul iniţial. În timpul trecerii prin coloană, soluţia proteică îşi modifică pH-ul de la 9,0 (pH-ul conjugării) la 7,0.

Cromatografia pe DEAE — celuloză (17) (15)

DEAE-celuloza are un mod de acţiune complex, eliminînd nu numai materialul fluorescent nereacţionat, dar şi componentele proteice lipsite de activitate imunologică. Din acest motiv, trecînd peste DEAE-celuloză un antiser fluorescent integral, se reţine nu numai materialul fluorescent nereacţionat, dar şi fracţiunile proteice imunologic inactive, necuplate sau cuplate cu substanţa fluorescentă. Această proprietate a DEAE-celulozei permite folosirea la conjugare a antiserurilor integrale sau a preparatelor brute de anticorpi.

DEAE-celuloza se spală cu tampon fosfat 0,01 M, pH 8,0, pînă supernatantul ia pH-ul tamponului, şi apoi se introduce în coloană. Se încarcă apoi coloana cu soluţia fluorescentă. Tot cu acest tampon se efectuează şi eluţia.

După ce nu mai iese proteină din coloană (control spectrofotometric) se creşte treptat concentraţia fosfatului pînă la 0,3 M sau se aplică un gradient de NaCl (pînă la 1 M). Gradientul se poate realiza în trepte sau continuu. Fracţiunile colectate se concentrează pînă la volumul dorit şi se determină capacitatea lor de colorare.

Scanned with OKEN Scanner

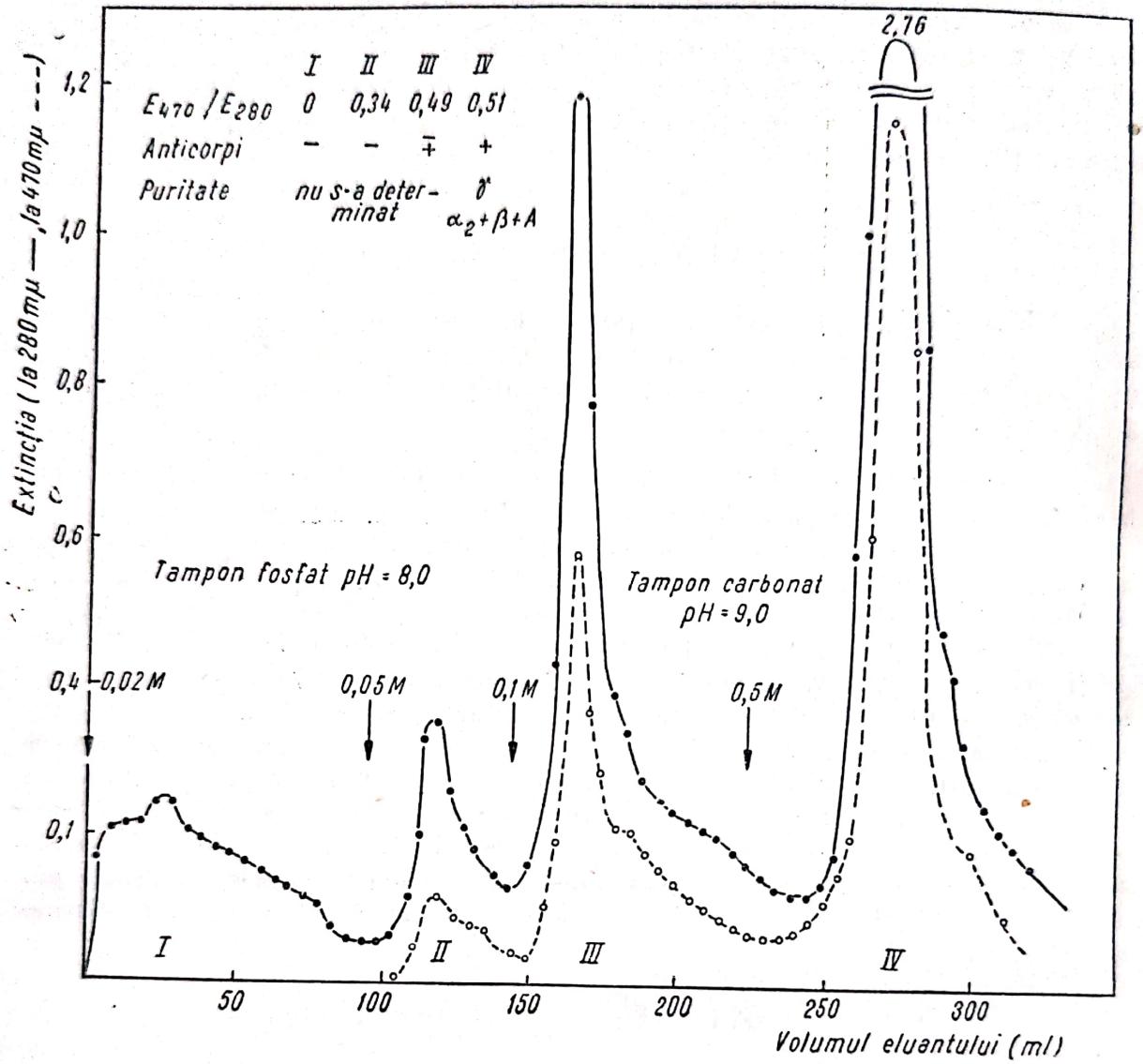


Fig. 100. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a antiserului de cal fluorocromat cu izotiocianat de fluoresceină.

Dacă se cromatografiază un antiser total fluorocromat (29), anticorpii vor părăsi coloana în altă ordine decît în cazul antiserului nefluorocromat şi vor fi impurificate cu alte proteine serice (fig. 100). Prin cromatografiere se produc pierderi ale proteinei active care pot atinge 50%.

Absorbţia cu pulbere de ţesut

Pulberea de ţesut absoarbe nu numai substanţele proteice imunologic inerte, dar şi substanţele fluorescente nereacţionate în proporţie de 70% (pentru izotiocianatul de fluoresceină (21). De aceea, eficienţa sa în stingerea colorației nespecifice este mare.

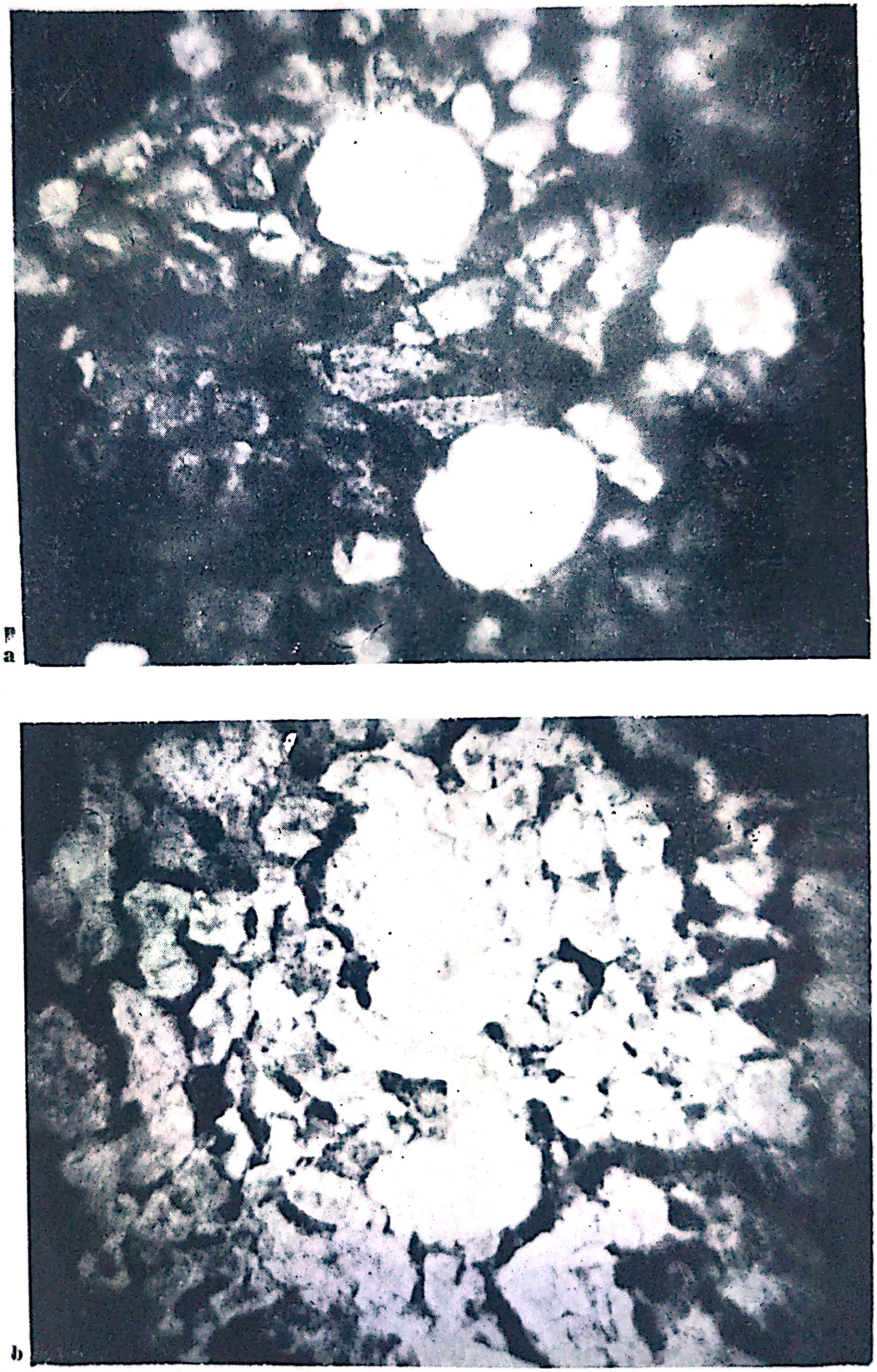


Fig. 101. — Secțiune prin rinichiul de șobolan, colorată cu anticorpi fluorescenți absorbiți (a) și neabsorbiți (b) (după R. C. Mellors, 1959).

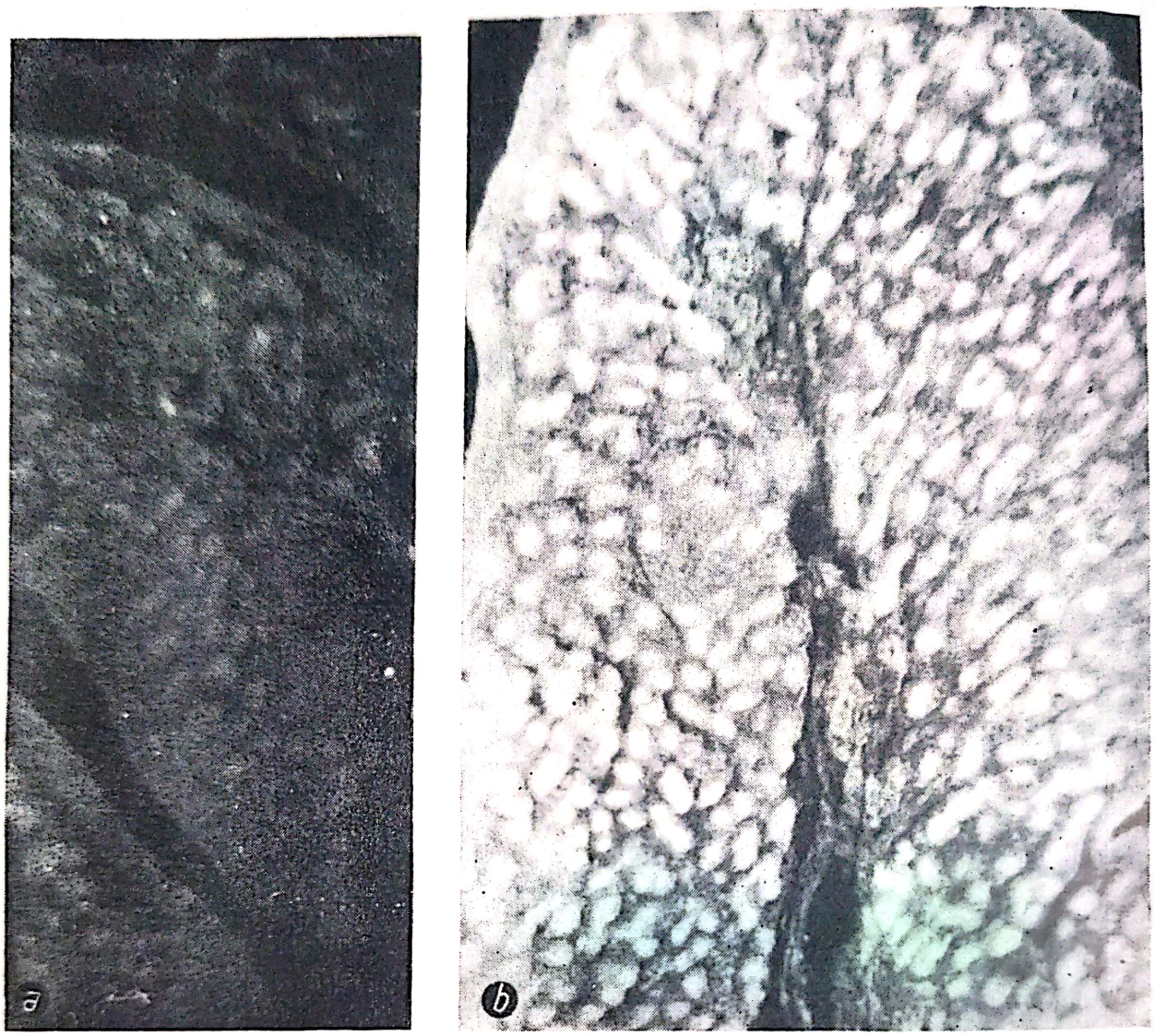


Fig. 102. — Secțiune prin oviductul de porumbiță (după N. St. Chișiu și colab., 1966). a, Martor; b, colorație cu un ser imun fluorescent de iepure anti-albuș de ou de găină.

Scanned with OKEN Scanner

Absorbţia se foloseşte pentru determinările de rutină, în care se utilizează antiseruri integrale, fluorocromate. Eficienţa absorbţiei cu pulbere de ţesut pentru îndepărtarea coloraţiei nespecifice este ilustrată în figura 100.

Pulberea de ţesut se prepară prin omogenizarea unui organ, de obicei ficat de şoarece sau de şobolan (8) (22), cu ser fiziologic, după care urmează precipitarea repetată a omogenatului cu acetonă şi uscarea cu acetonă sau prin liofilizare (v. anexa V).

Absorbţia se efectuează astfel : se adaugă pulberea de ţesut la soluţia de anticorpi fluorescenţi, în proporţie de 100 mg/ml. Se agită intermitent amestecul timp de o oră la temperatura camerei, după care se centrifughează la 14 000—18 000 rot/min timp de 20 min, de obicei la rece (4°C). Absorbţia se repetă întrebuinţînd tot 100 mg/ml pulbere de ţesut. După ultima centrifugare, conjugatul se controlează microscopic dacă nu conţine particule de pulbere de ţesut fluorescente, nedepuse prin centrifugare.

Conjugatele purificate prin această metodă sînt instabile, de aceea ele trebuie folosite cît mai repede posibil. Pe timpul experimentării, conjugatele purificate se păstrează cu mertiolat 0,01 g % la 4°C sau mai bine la —10°C în întuneric.

V. PREGĂTIREA MATERIALULUI BIOLOGIC

Imunoprecipitarea cu anticorpi fluorescenţi se efectuează mai ales în secţiuni de ţesuturi şi în materiale citologice (frotiuri de celule, bacterii, protozoare, fungi etc.). Pregătirea acestor materiale biologice nu se poate efectua prin metode curente histologice, citologice şi bacteriologice, deoarece deseori acestea produc alterarea grupărilor imunologic active ale antigenelor cercetate. De aceea, în vederea colorării imunofluorescente, secţiunile de ţesuturi se obţin prin îngheţarea şi secţionarea lor în stare îngheţată, urmată de o fixare cu ajutorul unor soluţii care nu modifică structura antigenelor. Din materialele citologice se obţin frotiuri prin mijloace curente, însă fixarea se face de asemenea prin metode speciale care nu influenţează structura antigenelor.

În aceste operaţii, un moment deosebit îl reprezintă îngheţarea ţesutului. Este folosită îngheţarea, deoarece are trei avantaje principale :

a) opreşte procesul de distrugere a proteinelor imunologic active, care începe în ţesut după prelevarea lui din organism ;

b) blochează difuziunea antigenelor, împiedicînd deplasarea lor în ţesuturi în timpul prelucrării ;

c) permite secţionarea la microtom în condiţii care nu afectează structura microscopică a ţesutului şi activitatea imunologică a antigenului cercetat.

Scanned with OKEN Scanner

1. Metode de obţinere a secţiunilor

În prezent se folosesc două metode principale de obţinere a secţiunilor de ţesuturi: metoda secţiunilor îngheţate şi metoda secţiunilor liofilizate (24). În ambele metode, proteinele tisulare (antigene sau anticorpi) nu-şi modifică proprietăţile imunologice.

Alături de aceste metode, care cer instalaţii şi operaţii complicate, se poate folosi şi o tehnică simplă, care foloseşte încluderea materialului biologic în parafină, după fixare cu etanol.

Metoda secţiunilor îngheţate (22)

Se taie blocuri de ţesut proaspăt cu o suprafaţă şi grosime potrivite pentru microtomie. Se transferă blocurile pe lame de microscop şi se îngheaţă brusc la — 40°C, fie prin aşezarea plăcilor pe zăpadă carbonică, fie prin învelirea lor într-o hîrtie impermeabilă şi acoperirea lor cu zăpadă carbonică. După îngheţare, lamele cu blocul de ţesut îngheţat se introduc în recipiente perfect închise şi se păstrează la — 20°C.

O îngheţare mai rapidă se realizează prin întrebuinţarea unui amestec de zăpadă carbonică şi etanol (—78°C). În acest caz blocurile de ţesut se introduc pe fundul unui vas plat care se scufundă în amestecul răcitor. După îngheţare se astupă ermetic vasul şi se păstrează de asemenea la — 20°C.

Secţionarea materialelor îngheţate se efectuează cu ajutorul microtomului. Se întrebuinţează de obicei un microtom cu cuţitul răcit cu zăpadă carbonică; temperatura la care se scot secţiunile este cuprinsă între — 5°C şi — 10°C. Se poate realiza o temperatură de tăiere şi mai joasă (—20°C), utilizînd un microtom răcit în întregime (criostat) (7).

Prima metodă de secţionare este mai simplă şi mai accesibilă, însă secţiunile obţinute nu au calitatea celor scoase din criostat[1]. În ambele cazuri, proteinele rămîn nealterate în ceea ce priveşte proprietăţile lor imunologice.

Blocurile de ţesut sînt desfăcute de pe suportul lor de sticlă cu un bisturiu şi ataşate apoi de suportul microtomului, răcit în prealabil cu zăpadă carbonică. Ataşarea se realizează prin udarea suportului cu cîteva picături de apă şi îngheţarea blocului de ţesut de către acesta. Se taie apoi secţiuni cu grosimea dorită. De obicei, secţiuni de 2—8 μ sînt perfect satisfăcătoare pentru colorarea imunofluorescentă. Secţiunile sînt luate de pe cuţit cu ajutorul unei chiurete răcite şi se plasează pe lame microscopice foarte curate, răcite. Se desgheaţă apoi rapid la temperatura camerei, aşezînd în dreptul secţiunii un deget sub lamă. Secţiunile sînt apoi uscate într-un curent de aer provenit de la un ventilator (10—15 min). Secţiunile astfel preparate se folosesc imediat pentru colorarea imunofluorescentă sau se păstrează pentru o scurtă perioadă de timp, peste sulfat de calciu, în frigider. Prin păstrare, secţiunile de ţesuturi îşi măresc autofluorescenţa, de aceea este indicată folosirea lor imediat după obţinere.

---

[1] Amănunte tehnice privind microtomia se pot găsi în E. A. S. Pearse, *Histochemistry, Theoretical and applied*, J. &. A. Churchill, Londra, 1960.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda secţiunilor incluse în parafină * (31)

Se recoltează o bucată de ţesut de 1/1 cm şi se imersează imediat în etanol 96%, răcit în prealabil la 4°C. *Toate operaţiunile ulterioare se fac la 4°C dacă nu se specifică altfel.* După 2 ore se scoate piesa şi se taie în blocuri mici de 4/2—4/4 mm. Secţiunile se imersează din nou în etanol 96% şi se ţin astfel pînă a doua zi (12—16 ore). Se trec apoi piesele în 4 băi succesive, de cîte 2 ore fiecare, în etanol absolut (pentru deshidratare) şi în 3—4 băi succesive, tot de 2 ore fiecare, în xilol (pentru clarificare). Ultima baie se scoate din frigider şi se lasă să atingă temperatura camerei . Se trec piesele prin 3—4 băi de parafină (foarte curată şi filtrată) de 1—2 ore fiecare, într-un termostat la 50°C.

După ultima baie de parafină se face includerea în bloc de parafină care se taie cu un microtom obişnuit, prelevînd secţiuni de 4 μ. Secţiunile se aşază pe suprafaţa apei dintr-o baie de apă distilată, termostatată la 42°C (pentru întindere). De aici sînt luate imediat pe o lamă de microscop (subţire, nefluorescentă şi perfect degresată) şi surplusul de apă se îndepărtează prin tamponare uşoară cu o hîrtie de filtru. Se introduc lamele într-un termostat la 37°C şi se ţin 2 ore (pentru uscare şi aderare).

Înainte de reacţia imună, lamele se deparafinează prin trecerea lor în 3 băi succesive de xilol. Fiecare spălare durează 15—20 sec şi se face prin mişcarea uşoară a lamei în xilol. Urmează 4 băi consecutive de etanol 96%, de cîte 15 sec fiecare. Etanolul se îndepărtează prin 4—6 băi cu soluţie salină tamponată la pH 7,0, cu fosfat 0,02 M. În total aceste băi durează 10—15 min, după care lamele sînt gata pentru colorarea imunofluorescentă.

Avantajul metodei constă în faptul că blocurile de parafină pot fi reutilizate şi după o perioadă mai lungă, cu condiţia ca ele să fie păstrate la 4°C. Metoda poate fi aplicată la detectarea tuturor antigenelor care nu-şi modifică specificitatea în urma prelucrării. Conservarea integrităţii grupărilor determinate ale antigenelor depinde în bună măsură de modul în care se parcurge fiecare etapă de prelucrare a secţiunilor. Astfel, ovalbumina poate fi pusă în evidenţă în oviduct cu un antiser specific, deşi s-a considerat că ea nu poate fi evidenţiată prin această tehnică (4) (fig. 102).

2. Prelucrarea secţiunilor înaintea colorării (1)

Secţiunile obţinute prin îngheţare trebuie să fie fixate înaintea colorării, deoarece îngheţarea este numai un mijloc de preparare a ţesuturilor şi nu de fixare a lor.

Metodele de fixare depind de natura antigenului cercetat. Pentru antigene de natură proteică, cel mai întrebuinţat fixator este etanolul 95%. Se mai poate întrebuinţa metanol şi acetonă. Lamele microscopice conţinînd secţiunile se introduc în cutii Coplin conţinînd etanol 95% încălzit la 37°C. Se ţin la această temperatură 15 min după care se scot şi se aşază vertical într-un termostat la 37°C, timp de 30 min, pentru îndepărtarea alcoolului. Înainte de aplicarea reactivului fluorescent, secţiunile se clătesc cu soluţie salină tamponată.

---

* Metoda G. Saint Marie completată de N. Şt. Chişiu.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenele conţinînd lipide (de ex. antigenul Forssman) sînt alcool-solubile, de aceea pentru fixarea lor se poate întrebuinţa o soluţie de formol 10%.

Alegerea celui mai eficient fixator trebuie făcută de experimentator în raport cu natura antigenului investigat şi cu obiectivele cercetării. Întotdeauna este necesar un control al acţiunii fixatorului, deoarece chiar un tratament chimic moderat poate modifica antigenul.

3. Greşeli în manipularea materialului biologic

Greşelile comise în cursul preparării materialului biologic dau naştere de obicei la două fenomene neplăcute : apariţia artefactelor şi alterarea proprietăţilor imunologice ale proteinei studiate.

Artefactele sînt cauzate, în general, de formarea cristalelor mari, destructive, în cursul îngheţării sau dezgheţării preparatelor. Formarea acestor cristale este cauzată mai ales de două inexactităţi experimentale :

a) Nu s-a efectuat o îngheţare şi o dezgheţare bruscă, rapidă a materialului biologic.

b) Materialele îngheţate sînt păstrate la temperaturi prea ridicate. Astfel un ţesut îngheţat la — 78°C trebuie păstrat la — 20°C. Timpul de păstrare al secţiunilor este limitat, atît de formarea treptată a cristalelor, cît şi de apariţia autofluorescenţci care stînjeneşte observarea microscopică a coloraţiei specifice.

Temperatura la care se scot secţiunile cu microtomul are mare importanţă. Dacă temperatura ţesutului este sub — 45°C, el devine friabil şi nu se poate tăia. Uneori chiar între — 40°C şi — 15°C din unele ţesuturi se scot secţiuni sfărîmicioase la microtomul cu cuţitul răcit. Acest fenomen nu se observă în criostate şi este probabil cauzat de gradientul de temperatură care există între cuţit şi ţesut.

Alterarea proprietăţilor imunologice ale proteinelor este produsă mai ales în cursul fixării, deşi nu este exclus ca acest fenomen să aibă loc şi în timpul uscării la aer a secţiunilor sau chiar în cursul liofilizării. Şi din acest motiv este contraindicată păstrarea secţiunilor în exsicator, peste sulfat de calciu, un timp prea îndelungat.

VI. TEHNICA COLORĂRII CU ANTICORPI FLUORESCENŢI

În posesia secţiunilor fixate şi a reactivului imunologic purificat, experimentatorul poate alege două căi principale de colorare a antigenelor sau a anticorpilor intracelulari : colorarea directă şi colorarea indirectă. Prima dintre aceste două tehnici este întrebuinţată numai pentru detectarea antigenelor, în timp ce ultima serveşte atît la evidenţierea antigenelor, cît şi a anticorpilor. Concentraţia soluţiei de anticorpi fluorescenţi poate varia în limite foarte largi (0,05—0,5 g% proteină), în funcţie de natura experienţei montate.

Scanned with OKEN Scanner

1. Colorarea directă (5)

Tehnica de lucru. Lamele care conțin secțiunile fixate se clătesc cu o soluție salină tamponată și apoi se usucă prin ștergerea regiunilor din jurul secțiunii. Cu o pipetă capilară se adaugă cîteva picături din soluția de anticorpi fluorescenți, avînd grijă ca suprafața secțiunii să fie acoperită în întregime. Lama se introduce într-o cutie Petri al cărui capac este căptușit cu hîrtie de filtru umezită pentru a preveni evaporarea reactivului fluorescent. Reacția se desfășoară la temperatura camerei, 20—30 min. După acest interval de timp se îndepărtează reactivul, iar secțiunile se spală repetat timp de 10 min cu soluție salină tamponată, într-un vas Coplin. Se usucă lama prin ștergerea regiunii din jurul secțiunii. Secțiunea se montează adăugînd cîteva picături de glicerină tamponată [1], peste care se aplică o lamelă. Deoarece glicerina are o fluorescență slabă cenușie-albastră, stratul de glicerină trebuie să fie foarte subțire. Dacă substanța fluorescentă difuzează în glicerină, este un indiciu că lamele n-au fost suficient spălate. Dacă secțiunile sînt destinate numai colorării imunofluorescente, lamele pot fi încadrate cu parafină pentru o mai bună conservare. Lamele astfel preparate sînt supuse microscopiei în ultraviolet. Dacă în secțiuni sînt prezente antigene față de care s-a preparat antiserul fluorescent, ele vor apare ca niște puncte sau zone fluorescente pe fondul negru al celulei.

Controlul specificității reacției. La colorarea imunofluorescentă, ca și la orice altă tehnică imunochimică, controlul specificității este o operație care asigură acurateță și certitudine rezultatelor. Cînd se obține cu ajutorul procedeului de colorare direct o imagine a secțiunii care pare a fi specifică, controlul specificității se efectuează prin mai multe procedee :

a) Inhibarea specifică a reacției de colorare prin anticorpi specifici nefluorescenți. Alături de lama colorată direct, se mai prepară două lame I și II, luînd două secțiuni consecutive din microtom. Peste lama I se pun cîteva picături din antiserul omolog nefluorescent. Peste secțiunea II se aplică cîteva picături dintr-un ser normal, de asemenea nemarcat. Se acoperă lamele și se lasă să stea la temperatura camerei 20 min. Se spală cu soluție salină tamponată, timp de 5 min și apoi, peste fiecare secțiune, se adaugă antiserul omolog fluorescent. Se acoperă din nou lamele și se lasă să stea încă 10 min. Se spală apoi cu soluție salină tamponată, timp de 10 min, se montează cu glicerină tamponată și se examinează la microscopul cu fluorescență. Dacă s-a produs reacția specifică antigen—anticorp, atunci în lama I fluorescența va fi foarte slabă sau chiar absentă, în timp ce lama II va fi colorată cu o intensitate asemănătoare lamei tratate direct cu antiserul fluorescent.

Pentru realizarea acestei reacții de control, trebuie avută în vedere tendința de înlocuire din imunoprecipitat a anticorpului nefluorescent prin anticorpul fluorescent. De aceea trebuie să se varieze concentrația reactivului nefluorescent și fluorescent în timpul reacției, pentru a demonstra net inhibiția.

b) Abolirea colorării imunofluorescente prin îndepărtarea anticorpilor marcați dintr-un antiser fluorescent.

---

[1] Glicerina tamponată este compusă din 9 părți glicerină anhidră și o parte soluție de NaCl 0,145 M, tamponată la pH 7,0 cu fosfat 0,5 M.

Scanned with OKEN Scanner

Prin adăugarea unei cantităţi potrivite de antigen în stare cît mai pură, la o parte alicotă de antiser fluorescent, se îndepărtează prin precipitare sau prin neutralizare anticorpii specifici corespunzători.

c) Secţiunile cuprinzînd materialul antigenic studiat nu se colorează cu conjugate preparate din seruri normale sau antiseruri eterologe obţinute de la aceeaşi specie de animal.

d) Dacă se studiază distribuţia unor antigene străine, atunci soluţiile de anticorpi fluorescenţi nu trebuie să reacţioneze cu ţesutul normal.

e) Distrugerea specificităţii antigenului prin unii fixatori chimici (pentru proteine formol 40 %) împiedică colorarea cu anticorpii fluorescenţi corespunzători.

2. Colorarea indirectă aplicată la detectarea antigenelor (5) (2)

Colorarea indirectă sau *tehnica straturilor multiple* se efectuează în două etape (v. principiul metodei) şi prezintă două avantaje principale : permite studiul localizării unui mare număr de antigene cu ajutorul unui singur conjugat fluorescent (anti-γ-globulinic) şi are o sensibilitate mai mare decît colorarea directă. Sensibilitatea mai mare este determinată de împrejurarea că de complexul antigen-anticorp se fixează un număr mai mare de anticorpi fluorescenţi decît de antigenul singur (fig. 103).

Anticorpii specifici nemarcaţi folosiţi în etapa I a colorării indirecte trebuie să provină de la o specie de animal a cărei γ - globulină nu dă o reacţie încrucişată cu γ- globulina speciei studiate. În caz contrar, serul fluorescent anti- γ -globulinic va colora nu numai complexul specific antigen-anticorp, ci şi γ - globulinele care se găsesc în mod normal în celulele studiate.

Anticorpii fluorescenţi anti - γ - globulinici de om sau de iepure, întrebuinţaţi în etapa a II-a a tehnicii, pot fi preparaţi din seruri imune de cal, capră, pasăre, bou şi iepure.

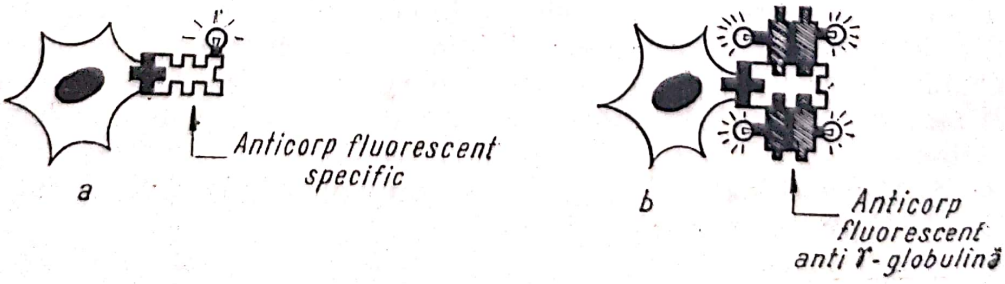


Fig. 103. — Compararea fluorescenţei precipitatului imun prin : a, colorare directă şi b, colorare indirectă (adaptat după R. C. Mellors, 1959).

Tehnica de lucru. Secțiunile se acoperă cu cîteva picături din serul specific nemarcat, diluat 1/10. Reacția se desfășoară în condițiile arătate la colorarea directă, timp de 20 min. Se spală apoi în cîteva rînduri lamele cu soluție salină tamponată, timp de 10 min. După ce s-au uscat lamele prin ștergere (cu excepția ariei secțiunii), se adaugă 1—2 picături din serul fluorescent anti-γ-globulinic, preparat față de γ-globulina speciei de la care se obține antiserul specific nemarcat. Colorarea se efectuează în cameră umedă, timp de 20 min, după care lamele se spală cu soluție salină tamponată și se montează în glicerină tamponată (amănuntele sînt date la colorarea directă). Astfel preparate, lamele se examinează la microscopul în ultraviolet.

Controlul specificității reacției. Alături de secțiunea cercetată, se prepară încă două secțiuni. Una din ele se tratează direct cu serul anti - γ - globulinic fluorescent, fără o expunere prealabilă la antiserul specific nemarcat. Pe cealaltă secțiune se aplică ser normal sau antiser eterolog, obținut de la specia care furnizează și antiserul specific nemarcat. Se tratează apoi cu antiser fluorescent anti - γ - globulinic. În ambele cazuri, apariția unei colorații fluorescente detectează o reacție nespecifică.

3. Colorarea indirectă aplicată la detectarea anticorpilor (8) (5)

Secțiunile țesutului care conține anticorpul dat se tratează în prima etapă cu antigenul corespunzător, care se combină cu grupările reactive libere ale anticorpului. În etapa a II-a, prezența antigenului este descoperită prin tratarea secțiunilor cu anticorpi preparați față de acest antigen și marcați cu o substanță fluorescentă (23).

Tehnica de lucru. Secțiunile se fixează în etanol 95° timp de 15 min, la 37°C. Se usucă apoi lamele într-un termostat, 30 min, după care secțiunile se clătesc cu soluție salină tamponată. Se usucă lamele prin ștergerea regiunii din jurul secțiunii și se aplică apoi 1—2 picături din soluția de antigen specific. Concentrația optimă a soluției de antigen trebuie determinată prin experiențe preliminare. În unele cazuri (8) (5) (16) s-a găsit că o concentrație a antigenului de 0,5 mg/ml este satisfăcătoare. După 30—45 min de incubare, soluția de antigen se îndepărtează și secțiunea se spală 10 min cu soluție salină tamponată. Se usucă prin ștergerea lamei, cu excepția suprafeței secțiunii, apoi se aplică cîte o picătură din soluția de anticorpi fluorescenți preparați față de antigenul studiat. După 20—30 min se spală lama cu soluție salină tamponată, timp de 10 min, se montează în glicerină tamponată și se examinează la microscopul cu fluorescență.

Controlul specificității reacției. Se ia o secțiune din țesutul studiat și se tratează direct cu anticorpul fluorescent, fără o expunere prealabilă la acțiunea antigenului specific. Examinată la microscop, secțiunea nu trebuie să prezinte fluorescență. Dacă totuși se detectează o fluorescență, ea poate avea două cauze : persistența în țesuturi a antigenului sau o reacție nespecifică.

Dacă fluorescența se datorește persistenței în țesuturi a antigenului care a servit la imunizarea animalelor, ea poate fi inhibată specific prin oricare din metodele descrise la colorarea directă a antigenului. În caz că

Scanned with OKEN Scanner

fluorescenţa nu poate fi inhibată, ea trebuie atribuită unei reacţii nespecifice dintre anticorpii fluorescenţi şi un component oarecare al ţesutului normal.

4. Sensibilitatea metodelor de colorare

Metoda anticorpilor fluorescenţi poate detecta cantităţi foarte mici de material antigenic. Pentru antigenul capsular de pneumococ, cantitatea minimă care poate fi detectată este cuprinsă într-un singur germene, reprezentînd 5. 10^{-11} mg N. Rezultate similare s-au obţinut şi pentru alte microorganisme.

Limita de antigen detectabilă este în jur de 25 μg/g ţesut sau 100 μg/ml soluţie. Raportată la suprafaţa examinată microscopic, aceste date arată că într-un preparat se pot identifica antigene pînă la o concentraţie cuprinsă între 0,8 şi 1,4, 10^{-4} g/mm² (25).

Comparată cu celelalte metode imunologice, colorarea imunofluorescentă are o sensibilitate mai mare decît reacţia de precipitare, egală cu reacţia de fixare a complementului şi mai mică decît aglutinarea.

Sensibilitatea metodei depinde de tehnica de colorare aplicată. Din datele existente rezultă că sensibilitatea tehnicii de colorare indirectă este superioară celei de colorare directă.

VII. EXAMINAREA PREPARATELOR ÎN ULTRAVIOLET

1. Microscopia cu fluorescenţă (33) (27)

Imunoprecipitatele fluorescente absorb radiaţia ultravioletă de diferite lungimi de undă şi convertesc o parte din energia absorbită în lumină vizibilă, cu o lungime de undă mai lungă.

Spectrul luminii absorbite este constituit din acele lungimi de undă care sînt eficiente în excitarea materialului fluorescent. Din acest motiv se folosesc filtre care selecţionează din radiaţia ultravioletă numai lungimile de undă care produc excitarea fluorocromului cu care s-a făcut marcarea anticorpilor. Astfel, pentru anticorpii marcaţi cu fluoresceină, cea mai eficientă este iluminarea cu radiaţii din ultravioletul apropiat (390-440 mμ). Spectrul luminii emise prezintă un maxim în domeniul vizibil care dă socoteală de culoarea caracteristică a fluorescenţei.

Principalul avantaj al microscopiei cu fluorescenţă îl constitue marea ei sensibilitate la care se adaugă şi contrastul puternic furnizat de fluorescenţă. Pe lîngă acest avantaj, microscopia cu fluorescenţă are dezavantajul unei puteri de rezoluţie mai mici decît microscopia în vizibil . Ea decurge din faptul că lumina fluorescentă este emisă în toate direcţiile de la locul ei de origine, şi numai o parte din ea este captată de obiectivul microscopului. Acest neajuns este corectat în parte prin folosirea unor obiective cu

Scanned with OKEN Scanner

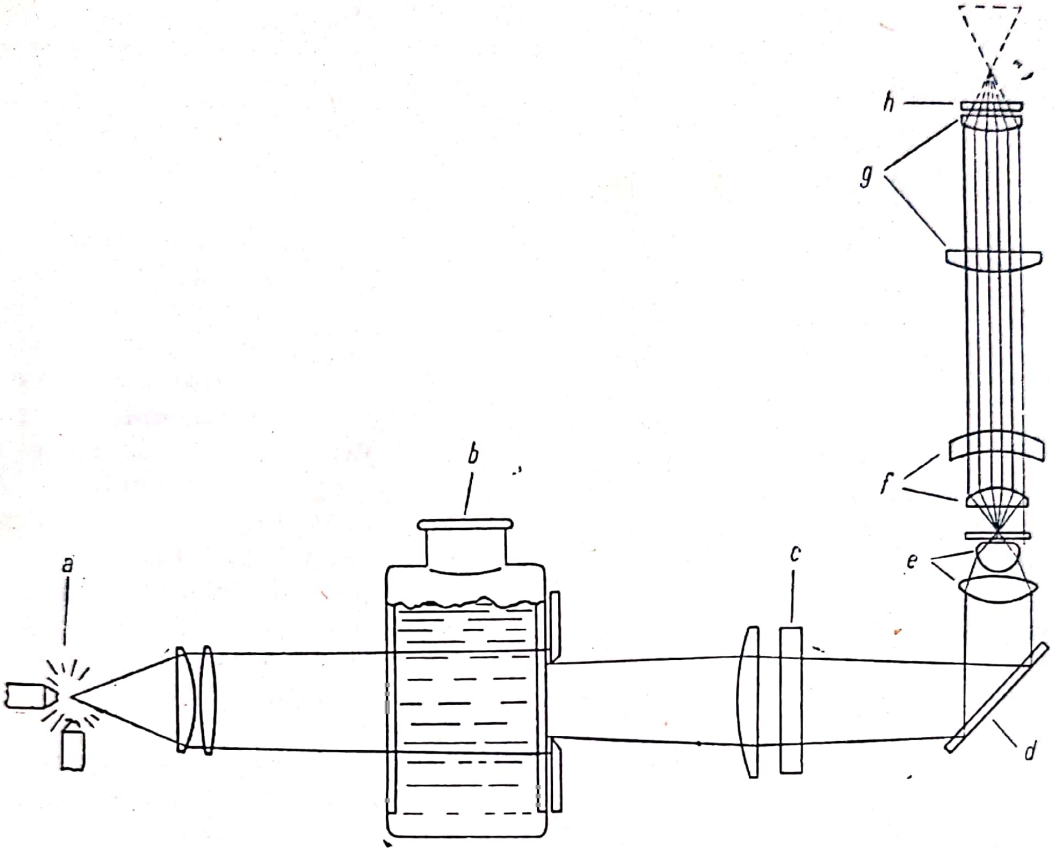


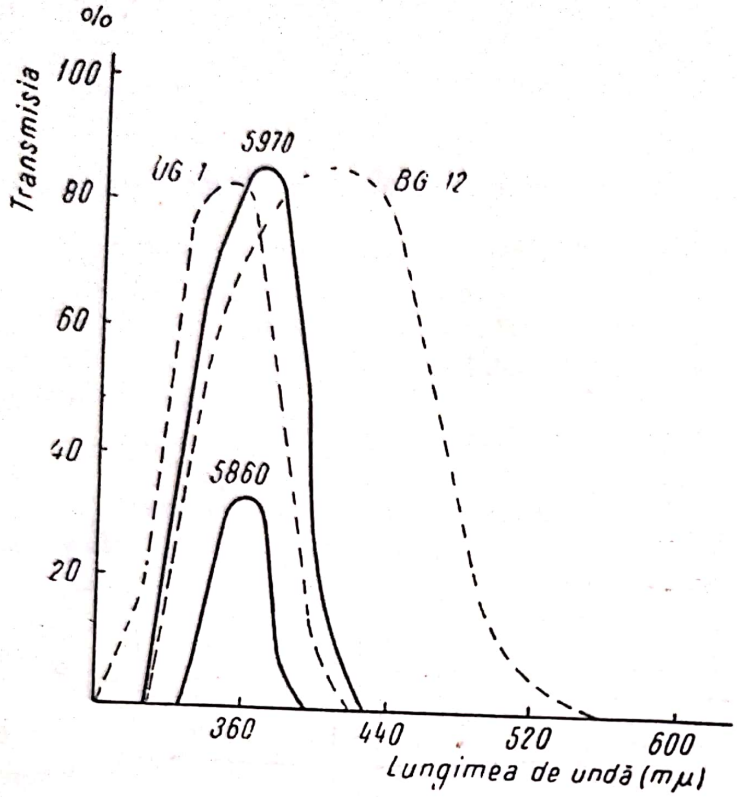
Fig. 104. — Schema microscopului cu fluorescență (VEB Carl Zeiss, Jena).
a. Sursă de lumină; *b*, chiuvetă cu sulfat de cupru; *c*, filtru de transmisie; *d*, oglindă; *e*, condensator; *f*, obiectiv; *g*, ocular; *h*, filtru de absorbție.

apertură numerică (N. A.) mare. În plus, din cauza cantităților mici în care se găsesc antigenele sau anticorpii în celule, intensitatea fluorescenței este scăzută. Din acest motiv, pentru observații uzuale, este necesară creșterea contrastului prin eliminarea din cîmpul vizual al oricărei lumini. Deci examenele microscopice se fac într-o cameră întunecată.

Schema instalației pentru microscopia în ultraviolet este dată în figura 104.

Surse de lumină ultravioletă. Sursele folosite în metoda anticorpilor fluorescenți au o caracteristică comună : luminozitatea mare. S-au folosit cu succes două feluri de surse : arcul de carbon, cu alimentare automată, și arcul de mercur, la presiune înaltă. Ultimul este preferabil, deoarece, spre deosebire de arcul de carbon, nu degajă căldură și gaze toxice. Se folosesc în special lămpile HBO 200 (Osram, Zeiss).

Filtre. În toate cazurile trebuie să se folosească două tipuri de filtre. Primul, denumit *filtru de transmitere* sau de excitație, se așază între sursa luminoasă și obiectul cercetat. El lasă să treacă numai lungimile de undă ultraviolete excitatoare și absoarbe orice altă lumină vizibilă emisă de



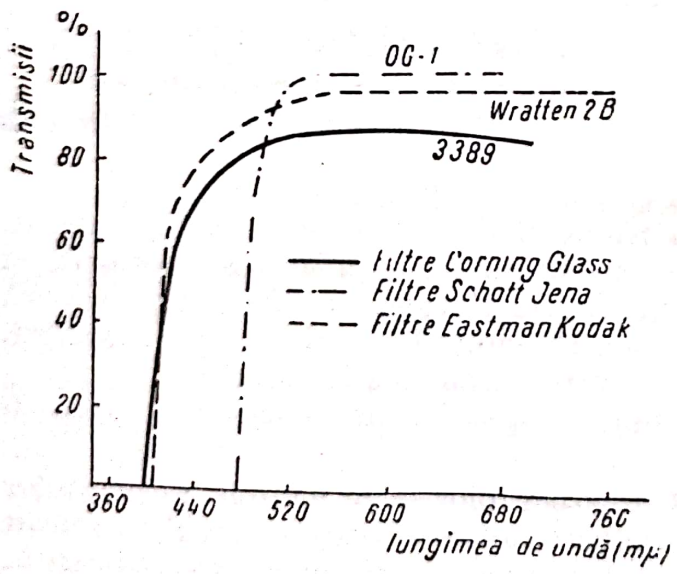


Fig. 105. — Curbele de transmitere ale unor filtre de transmisie (a) şi de absorbţie (b). Linia continuă: Corning Glass; Linia întreruptă: filtre Schott Jena.

sursă. Al doilea, denumit *filtru de absorbţie, sau de baraj*, se aşază între preparat şi ochiul observatorului. El transmite lungimile de undă fluorescente, emise de preparat şi absoarbe radiaţiile ultraviolete care provin de la sursă. În prezenţa unui material fluorescent, dacă se inversează cele două filtre, nu trebuie să se observe nici un fel de fluorescenţă.

Filtre de transmitere a ultravioletului. Filtrele se aleg astfel încît să dea transmiterea maximă a lungimilor de undă cele mai eficiente în excitarea materialului fluorescent (conform spectrului său de absorbţie). Cele mai folosite filtre sînt cele produse de firmele Corning Glass Co. (5 113, 5 840, 5 970 etc.) şi Schott Jena (BG-12, UG-1, UG-2 etc.). Caracteristicile unora din aceste filtre sînt date în figura 105.

Deoarece filtrele obişnuite (cu excepţia filtrului Corning 5 860) lasă să treacă lumina roşie, ele trebuie folosite în combinaţie cu o soluţie de sulfat de cupru 3—10%, aşezată într-o cuvetă cu o grosime de 3—4 cm.

Filtre de absorbţie a ultravioletului. Filtrele se aleg astfel ca să transmită toate radiaţiile emise de preparat şi să absoarbă radiaţiile excitante. Ele se aşază deasupra ocularului. Filtre satisfăcătoare, care îndepărtează radiaţiile sub 420 mμ, sînt produse de firmele Corning Glass Co. (3 486, 3 389), Eastman Kodak Co. (Wratten 2A şi 2B) şi Schott Jena (GG-9, OG-1). Caracteristicile unor filtre sînt date în fig. 105.

Scanned with OKEN Scanner

Microscopul. Pentru metoda anticorpilor fluorescenţi se poate folosi un microscop obişnuit echipat cu obiective acromatice.

Se poate folosi un condensator pentru cîmp întunecat. În acest fel, contrastul fluorescenţei creşte la maximum. Se pot utiliza şi condensatori aplanici cu apertură numerică mare (N. A. 1,40), cu cît mai puţine lentile posibil. Cu condensatoarele obişnuite se concentrează în preparat o energie excitantă mai mare decît cu condensatorul de cîmp întunecat, deci şi intensitatea luminii emise va fi mai mare. Cum intensitatea mai mare este asociată însă cu un contrast mai mic, examinarea vizuală este mai dificilă în acest caz. În schimb, fotografierea se realizează în condiţii foarte bune.

Microscopia cu fluorescenţă se efectuează cu un microscop monocular, deoarece intensitatea fluorescenţei de obicei nu este suficient de mare pentru observarea în sistemul binocular. Sistemul binocular reduce la mai mult de jumătate intensitatea luminii prinsă de ochiul experimentatorului.

2. Tehnica examinării preparatului

Producerea optimă a imaginii. Condensatorul obişnuit al microscopului se înlocuieşte cu un condensator paraboloid sau cardioid, care permite executarea examenului în cîmp întunecat. Se poate folosi un condensator cardioid de tip imersie cu N. A. 1,20 (33).

Se pune o picătură de glicerină sau alt ulei de imersie nefluorescent pe lentila superioară a condensatorului. O altă picătură de glicerină se pune pe faţa inferioară a lamei, sub secţiunea de examinat. Se ridică condensatorul încet, pînă cînd cele două picături se contopesc. Eliminarea aerului din spaţiul dintre lentila frontală a condensatorului şi lama microscopică creşte iradierea şi iluminarea relativă a preparatului examinat. Se pune la punct imaginea cu un obiectiv slab (3×, 10×,). În cîmp trebuie să apară o pată luminoasă (imaginea sursei de lumină), care se centrează cu ajutorul oglinzii şi se micşorează la maximum prin mişcarea uşoară pe verticală a condensatorului. După punerea la punct a imaginii, se examinează preparatul cu oricare din obiectivele uscate, pînă la apertura numerică de 0,85 (60×). Se pot folosi obiective cu apertură numerică mare numai în cazul intercalării glicerinei între condensator şi lamă. Dacă se foloseşte un condensator de cîmp întunecat uscat (fără glicerină) trebuie micşorată implicit şi apertura numerică a obiectivelor folosite. În aceste cazuri se pot folosi obiective cu apertură numerică de 0,30-0,40 (10×, 20×). În unele cazuri se pot folosi şi obiective speciale de imersie, 90×, cu diafragmul iris, a căror apertură (1,25) depăşeşte pe cea a conului de lumină a condensatorilor de cîmp întunecat (0,80).

Deoarece strălucirea imaginii este invers proporţională cu pătratul măririi, nu este indicată mărirea excesivă a secţiunilor studiate. Astfel se folosesc oculare cu putere de mărire moderată, un ocular de 5× fiind de 4 ori mai luminos decît unul de 10×.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru producerea optimă a imaginii, un rol important revine alegerii judicioase a filtrelor. Această alegere se face pe baza spectrului de absorbţie şi de emisie a materialului fluorescent de cercetat. Astfel pentru examinarea coloraţiilor imunofluorescente pe bază de fluoresceină, cele mai recomandabile combinaţii de filtre sînt :

a) Corning 5113. 4 mm, grosime, împreună cu soluţia de sulfat de cupru (filtru de transmitere), şi Corning 3486, 3 mm grosime (filtru de absorbţie);

b) Corning 5970, 5 mm grosime, împreună cu soluţia de sulfat de cupru (filtre de transmitere), şi Wratten 2 B cu Corning 3389, 2 mm grosime (filtre de absorbţie);

c) Corning 5840, 2,25 mm grosime, împreună cu soluţia de sulfat de cupru (filtru de transmitere), şi Wratten 2A sau 2B (filtre de absorbţie);

d) Jena BG-12 sau UG—1 (filtre de transmitere), şi Jena OG-1, sau GG—9 (filtru de absorbţie).

Lamele şi lamelele folosite la microscopia în ultraviolet trebuie să fie lipsite de fluorescenţă şi perfect curate, iar grosimea lamelor să nu depăşească 1 mm (în cazurile în care se folosesc condensatoare de cîmp întunecat). Toate operaţiile, consecutive colorării efectuate în vederea examinării microscopice, trebuie controlate dacă nu produc suprimarea fluorescenţei imunoprecipitatelor (quenching). Trebuie acordată mare atenţie pH-ului la care se efectuează operaţiile, fluorescenţa fiind modificată de variaţiile acestuia. În sfîrşit, trebuie avut în vedere că fluorocromii folosiţi în tehnica colorării imunofluorescente îşi micşorează treptat fluorescenţa prin iluminare prelungită (fading), de aceea secţiunile trebuie examinate în ultraviolet un timp cît mai scurt.

Fotografierea (12). Imaginea care trebuie fotografiată are un contrast mare, dar o luminozitate slabă. Din acest motiv trebuie folosite filme cu sensibilitate mare şi contrast mic. Chiar în aceste condiţii, timpul de expunere este mai mare ca în cazul microscopiei obişnuite în vizibil. Timpul aproximativ de expunere se determină prin cîteva tatonări sau mai exact cu un exponometru fotoelectric.

Folosind filme de 35 mm (Leika) cu sensibilitate mare, este necesar de obicei un timp de expunere de 2—15 min pentru negative alb—negru şi 4—30 min pentru negative colorate.

Microscopul trebuie fixat pe un suport greu, pentru a evita vibraţiile care, intervenind în timpul expunerii, înrăutăţesc calitatea fotografiilor.

Filmele pot fi ortocromatice şi pancromatice, după culoarea fluorescenţei care urmează a se înregistra. O fluorescenţă roşie—portocalie (lizamină—rodamină B 200) necesită filme pancromatice, în timp ce fluorescenţa galbenă—verzuie a fluoresceinei este mai bine înregistrată pe filme ortocromatice.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie

1. Barnett R. J. a. Roth N. D., J. Histochem. Cytochem., 1958, **6**, 406.
2. Beutner E. H., Bacteriol. Review, 1961, **25**, 49.
3. Cebra J. J. a. Goldstein G., J. Immunol., 1955, **95**, 230.
4. Chișiu N. St., Gheție V., St. cerc. biochim. (sub tipar).
5. Coons A. H., in Danielli J. F., *General cytochemical methods*, Acad. Press, New York, 1958, **I**, 400.
6. — Z. Pathol. u. Bakteriol., 1959, **22**, 693.
7. Coons A. H., Leduc E. H. a. Kaplan M. H., J. Exp. Med., 1951, **93**, 173.
8. Coons A. H., Leduc E. H. a. Connoly J. M., J. Exp. Med., 1955, **102**, 49.
9. Curtain C. C., J. Histochem., Cytochem., 1961, **19**, 484.
10. Dineen J. K. a. Ada G. C., Nature, 1957, **180**, 1284.
11. Goldstein G., Spalding B. H. a. Hunt N. B., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, **111**, 416.
12. Goldwasser R. A. a. Shepard C. C., J. Immunol., 1958, **80**, 122.
13. Gordon M. A., Edwards M. R. a. Tompinks V. N., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, **109**, 96.
14. Killander J., Ponten J. a. Roden L., Nature, 1961, **192**, 182.
15. Klugerman M. R., J. Immunol., 1965, **95**, 1 165.
16. Leduc E. H., Coons A. H. a. Connolly J. M., J. Exp. Med., 1955, **102**, 61.
17. Mc Devitt H. O., Peters J. H., Pollard L. W., Harter J. G. a. Coons A. H., J. Immunol., 1963, **90**, 634.
18. Mc Kinney R. M., Spillane J. T. a. Pearce G. W., J. Immunol., 1964, **93**, 232.
19. Mellors R. C., in Mellors R. C., *Analytical cytology*, Mc Graw-Hill Book Co., New York, 1959.
20. Metzgar R. a. Grace J., J. Immunol., 1961, **86**, 578.
21. Nairn R. C., *Fluorescent protein tracing*, E & S. Livingstone Edinburgh, 1962, 32—37.
22. Ortega L. G. a. Mellors R. C., J. Exp. Med., 1956, **104**, 151.
23. — J. Exp. Med., 1957, **106**, 627.
24. Pearse E. A. S., *Histochemistry. Theoretical and applied*, J. § A. Churchill, Londra, 1960, 137.
25. Pressman D., Yagi Y. a. Hiramoto R., Int. Arch. Allergy, 1958, **12**, 125.
26. Radetzki H. M., Proc. Soc., Exptl. Biol. Med., 1958, **98**, 120.
27. Richards O. W., in Mellors R. C., *Analytical cytology*, Mc Grow-Hill Book Comp., New York — Toronto — Londra, 1955.
28. Riggs J. L., Seiwald R. J., Burckhalter J. H., Downs C. M. a. Metcalf T. G., Amer. J. Pathol., 1958, **34**, 1 081.
29. Riggs J. L., Loh P. C., a. Eveland W. C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1960, **105**, 655.
30. Rinderknecht H., Nature, 1962, **193**, 167.
31. Saint Marie G., J. Histochem. Cytochem., 1962, **10**, 250.
32. Schell H. D. u. Gheție V., Rev. roum. de Biochim., 1964, **1**, 203.
33. Tobie J. E., J. Histochem. Cytochem., 1958, **6**, 271.
34. Tomase T. B., J. Immunol., 1961, **86**, 427.
35. Uehleke H., Z. Naturforsch., 1958, **13** *B*, 722.
36. Wood B. T., Thompson S. H., a. Goldstein G., J. Immunol., 1965, **95**, 225.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Anexa I

EXTRACȚIA ANTIGENELOR DIN FORMAȚIUNILE INTRACELULARE

Procedeele aplicate pentru extragerea antigenelor din nuclei, mitocondrii, cloroplaste și microzomi distrug integritatea lor morfologică, eliberînd constituenții din interiorul formațiunii și o parte din cei legați pe suprafața ei. Eliberarea antigenelor solubile poate fi realizată prin dezintegrare cu ultrasunete, înghețare-dezghețare, cu sau fără variații în presiunea osmotică a mediului, tratare cu dezoxicolat de sodiu, lecitinază sau detergenți ionici și neionici. Modul de acțiune al acestor agenți nu este identic, de aceea numărul și cantitatea antigenelor extrase vor depinde de procedeul aplicat. Trebuie evitată folosirea agenților care pot provoca alterarea structurii antigenice a materialului solubilizat.

Nuclei[1]. Deoarece membrana nucleară este foarte fragilă, pentru solubilizarea antigenelor din sucul nuclear este suficientă o simplă extragere cu clorură de sodiu 0,14 M. Se extrage astfel 20% din întregul material nuclear. Soluția conține proteine de tip globulinic și 2—8% acid ribonucleic. Repetînd extracțiile, de data aceasta cu clorură de sodiu 1—2 M, se obține 60—70% din întregul material nuclear. Soluția conține acid dezoxiribonucleic (33%) histone (50%), proteine (17%) și lipide (3—4%). Materialul rămas, constituit din nucleolii și cromozomii reziduali, se extrage cu hidroxid de sodiu 0,02 M. Se obține 5—6% din materialul nuclear total. Extractul conține proteine acide (60—70%), acid ribonucleic (16—20%) și lipide (12%). În sfîrșit, materialul rezidual insolubil reprezintă 4—5% din materialul nuclear total, fiind alcătuit în principal din membrane nucleare.

Mitocondrii[2]. Eliberarea antigenelor solubile din interiorul mitocondriilor poate fi realizată astfel: mitocondriile care provin din 10 g de ficat se suspendă în apă distilată (mediu hipotonic) și se îngheață la —15°C timp de 12 ore. Se dezgheață brusc la 37°C și se centrifughează amestecul. În supernatant se găsesc proteinele solubile din mitocondrii. Înghețarea se poate face și într-un mediu izotonic (0,25 M) sau hipertonic (0,44 M) de zaharoză. Prin acest tratament se eliberează 80% din componenții solubili ai mitocondriilor.

Folosirea dezoxicolatului de sodiu și a detergenților determină solubilizarea atît a proteinelor din interiorul mitocondriilor, cît și a unei părți din proteinele membranei și a septurilor intramitocondriale. Se procedează astfel: mitocondriile din 10 g de ficat se suspendă în 2,7 ml tampon TRIS, 0,05 M pH 8,0 sau în soluție de zaharoză 0,25 M și se adaugă 0,3 ml de dezoxicolat de sodiu 3%. Concentrația dezoxicolatului în amestec devine 0,3%. Se ține 30 min. la rece și suspensia se centrifughează apoi 30 min la 25 000 g. În supernatant se găsesc antigenele din interiorul mitocondriilor, împreună cu o parte din antigenele din membrana mitocondriilor.

În locul dezoxicolatului de sodiu se pot folosi în concentrații asemănătoare și următorii detergenți: Tipol X-50, Tween 20 și 80, Triton X-100. Dintre aceștia, cel mai eficient este detergentul neionic Triton X-100. Eliminarea dezoxicolatului și detergenților din soluția proteică

---

[1] I. B. Zbarski V-th Internat. Congr. Biochem., Simp. II Repr. 4, Moscova, 1961.

[2] L. Congiu Boll. Soc. Ital. Biol. Sperin., 1959, 35, 1367.

obținută poate fi realizată prin dializă sau filtrare prin gel de Sephadex G-25. În unele cazuri, în urma dializei, poate precipita o parte din proteinele hidrofobe menținute în soluție de aceste substanțe tensioactive.

Reziduul, care nu poate fi extras cu aceste substanțe, este alcătuit din membrane mitocondriale.

Microzomii[1]. Efectul diferitelor tratamente asupra solubilizării componenților din microzomi este prezentat în figura 106.

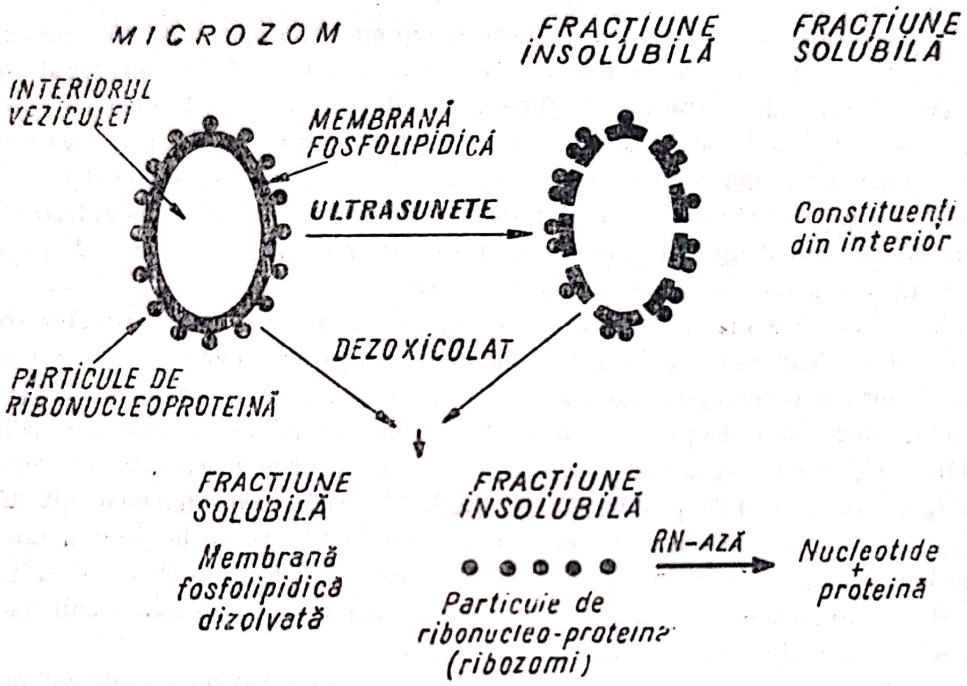


Fig. 106. — Extragerea antigenelor din microzomi.

Se obțin trei preparate : constituenții din interior (tratament cu ultrasunete), fracțiunea fosfolipidică solubilă (tratament cu ultrasunete și apoi cu dezoxicolat) și ribozomi insolubili (tratament cu dezoxicolat). Din ribozomi, proteinele pot fi eliberate sub acțiunea ribonucleazei.

Tehnicile curente folosite pentru extragerea antigenelor din microzomi utilizează numai acțiunea dezoxicolatului de sodiu și a detergenților. Se procedează astfel :

a) Depozitul de microzomi se suspendă într-o soluție conținînd 0,05 M TRIS, pH 8,0 și 0,6—0,8% dezoxicolat de sodiu. După o incubare de 30 min la 4°C, se centrifughează suspensia 30 min la 44 000 g pentru îndepărtarea microzomilor rămași intacți și apoi încă 120 min la 105 000 g. Supernatantul conține antigenele solubile care provin din interiorul microzomilor și din membranele fosfolipidice, iar depozitul este alcătuit din ribozomi.

Ribozomii se dizolvă într-o soluție 0,001 M de clorură de magneziu și se crește apoi treptat concentrația în clorură de magneziu. La 0,05 M precipită ribozomii. Ei se depun prin centrifugare de mică turație, se spală de două ori cu clorură de magneziu 0,01 M rece și depozitul se resuspendă într-o soluție de zaharoză 0,25 M. Se poate adăuga și 2% EDTA. Conținutul proteic al ribozomilor variază în funcție de sursa folosită între 41 și 60%.

[1] P. N. Campbell, V-th. Internat. Congr. Biochem., Simp. Repr. 114, Moscova, 1961.

Scanned with OKEN Scanner

b) Depozitul de microzomi se suspendă într-o soluție de zaharoză 0,25 M și se adaugă un detergent neionic, Lubrol W (polioxietilen cetilalcool), în concentrație de 0,5%. Porțiunea insolubilă a microzomilor se separă prin centrifugare 120 min la 105 000 g. Supernatantul conține proteinele solubilizate din membranele microzomiale, ca și conținutul veziculelor microzomiale.

Anexa II

PREPARAREA MEMBRANELOR SEMIPERMEABILE

Tuburile de celofan[1]. Modificarea tuburilor de celofan Visking poate fi realizată prin întinderea mecanică, acetilare și tratare cu $ZnCl_2$.

Tratare cu $ZnCl_2$. Se leagă la un capăt tubul de celofan și se umple cu o soluție de $ZnCl_2$ (64 g $ZnCl_2$ anhidru la 36 ml apă sau 65% (g/g)[2]). Se suspendă tubul într-un cilindru gradat, care conține de asemenea $ZnCl_2$. Umplerea tubului și a cilindrului se face simultan. În interiorul tubului, soluția se menține cu 1 cm deasupra nivelului din cilindru, pentru a realiza păstrarea diametrului inițial și întinderea tubului. Din timp în timp se adaugă $ZnCl_2$, menținîndu-se diferența de nivel dintre interiorul și exteriorul tubului. În funcție de porozitățile dorite, tratamentul durează între 1—15 min, după care soluția de $ZnCl_2$ se înlocuiește cu o soluție de HCl 0,01 N. După cîteva spălări cu această soluție și apoi cu apă distilată, membrana este gata pentru folosire. Pentru aceste operații se cere oarecare îndeminare, din cauză că pot apare distorsiuni ale membranei în timpul tratamentului cu $ZnCl_2$.

Porozitatea obținută se poate măsura indirect, determinînd permeabilitatea membranelor pentru molecule cu dimensiuni cunoscute.

Anexa III

NOMOGRAME PENTRU PREPARAREA TAMPOANELOR ACETAT ȘI FOSFAT*

Concentrația acetatului de sodiu este chiar puterea ionică a tamponului la temperatura de 25°C.

Pentru calcularea concentrației de K_2HPO_4 din soluție, se înmulțește fracția sa molară cu cantitatea totală de fosfat (în moli/litru). Temperatura 25°C.

---

[1] Craig L. C. a. Konigsberg W., J. Phys. Chem., 1961, **65**, 106.

[2] Rosenfeld M., Biochim Biophys. Acta, 1963, **75**, 281.

* Boyd W. C., J. Am. Chem. Soc., 1945, **67**, 1 036; Green A. A., J. Am. Chem. Soc., 1933, **55**, 2 331.

Scanned with OKEN Scanner

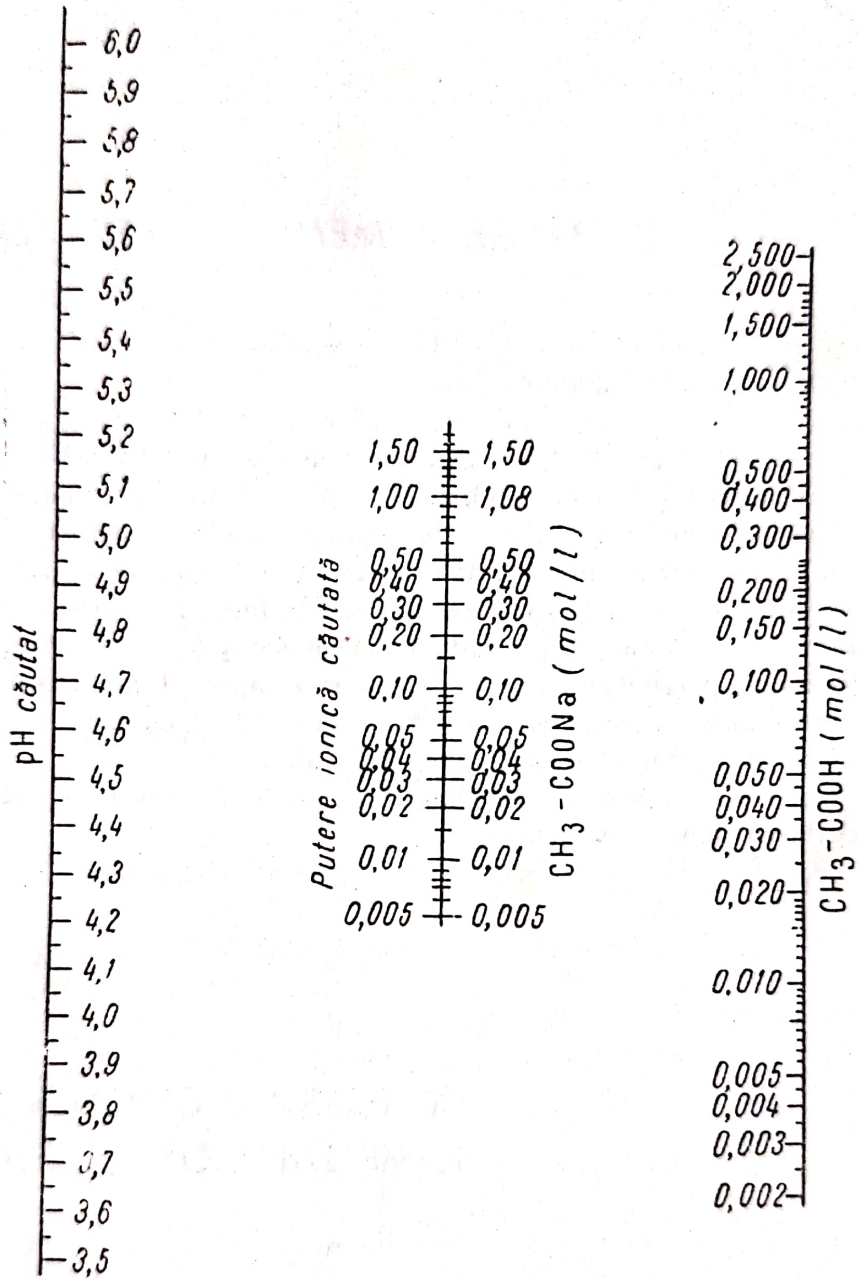


Fig. 107. — Nomogramă pentru prepararea tampoanelor acid acetic — acetat de sodiu cu diferite pH-uri și puteri ionice.

Scanned with OKEN Scanner

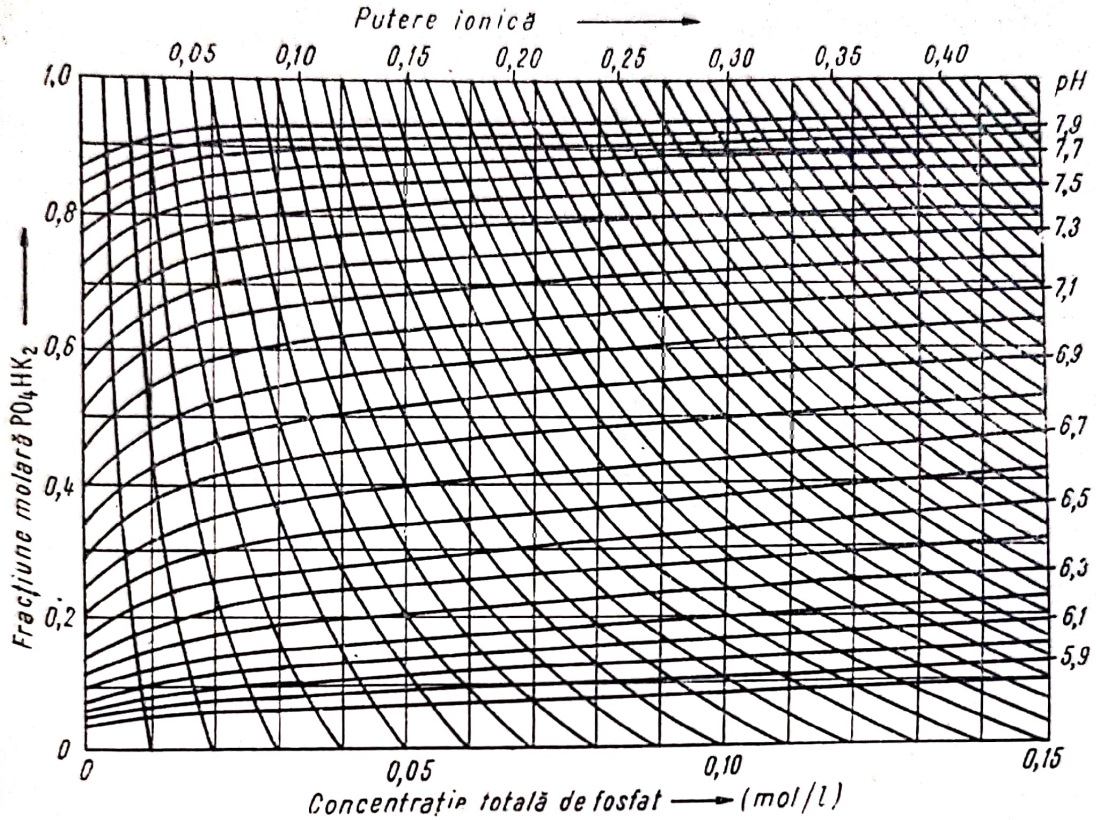


Fig. 108. — Nomogramă pentru prepararea tampoanelor fosfat monosodic — fosfat dipotasic cu diferite pH-uri şi puteri ionice.

Anexa IV

PREPARAREA P-AMINOBENZOILCELULOZEI

Procedeul lui Campbell[1]. Pulberea de celuloză se spală bine cu acid diluat, alcalii diluate şi apă distilată, după care se usucă. 4 g de celuloză spălată se suspendă în 30 ml NaOH 40% şi apoi se amestecă, agitînd puternic, cu 12 g din clorura acidului p-nitrobenzoic. Amestecul se ţine 4 ore la 95°C (în prima parte a experienţei amestecul trebuie răcit, deoarece reacţia este exotermă). Se varsă apoi amestecul într-un volum mare de apă distilată rece şi se filtrează. Reziduul se spală cu apă, etanol şi apoi cu acetonă într-un aparat Soxhlet. Randament 100 %.

Produsul astfel obţinut conţine 1,5 grupări nitrobenzoil pe unitatea de glucoză.

5 g din p-nitrobenzoilceluloza preparată se suspendă în 50 ml etanol şi se încălzeşte aproape de fierbere. Se introduc încet, sub agitare puternică, 5 g ditionit de sodiu ($Na_2S_2O_4.2H_2O$)

[1] Campbell D. H., Luescher E. a. Lernman L. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1951, 37, 575.

Scanned with OKEN Scanner

dizolvat în apă. Reducerea grupărilor nitro se continuă aproape de punctul de fierbere al amestecului încă 30 min.

Produsul galben deschis obținut este p-aminobenzoilceluloza, care se filtrează, se spală abundent cu apă rece și se usucă.

După diazotare imunosorbentul este capabil să fixeze 15 mg antigen/g.

Procedeul lui Gurvici[1]. Se dizolvă prin încălzire 70 g de clorură de p-nitrobenzoil în 70 ml de piridină absolută. La soluția obținută se adaugă 2 g de celuloză și amestecul se incubează 5 ore la 100°C. La masa densă și omogenă formată se adaugă 500 ml de piridină și apoi, sub agitare puternică, apă. Precipitatul depus (p-nitrobenzoilceluloza) se spală cu apă fierbinte și se trece într-un aparat Soxhlet în care se extrage cu acetonă. Produsul obținut se dizolvă în dimetilformamidă proaspăt distilată, din care se precipită adăugînd treptat acetonă. Se spală precipitatul cu acetonă și apă distilată.

Grupările nitro sînt apoi reduse pînă la grupări amino sub acțiunea sulfatului de bismut. Se poate aplica și reducerea cu ditionit de sodiu, după metoda descrisă mai înainte.

După diazotare, acest preparat este capabil să fixeze chimic 117 mg de antigen/g de imunosorbent. Conjugatul antigen-imunosorbent are, la rîndul său, capacitatea să adiționeze 104 mg de anticorpi specifici/g.

Anexa V

PREPARAREA PULBEREI DE ȚESUT USCATĂ CU ACETONĂ*

a) Se plasează 25—50 g de țesut proaspăt sau înghețat într-un omogenizator cu cuțite (Waring-Blendor) cu o cantitate egală în volum de ser fiziologic. Se omogenizează țesutul, evitînd încălzirea.

b) Se introduce omogenatul într-un vas și se adaugă 4 volume de acetonă, cu scuturare. Se lasă să stea 5—10 min, după care se îndepărtează supernatantul prin decantare.

c) Precipitatul se spală cu ser fiziologic, pînă cînd supernatantul devine liber de hemoglobină (se decolorează).

d) Precipitatul spălat se suspendă într-un volum egal de ser fiziologic și la această suspensie se adaugă 4 volume de acetonă cu scuturare. Se lasă să stea 5—10 min.

e) Se îndepărtează supernatantul prin decantare și se mai adaugă 4 volume de acetonă. Se colectează precipitatul prin filtrare la vid pe o pîlnie Büchner. Se spală pe filtru cu acetonă și se lasă să se usuce în pîlnie.

f) Se continuă uscarea la 37°C peste noapte. Pulberea se păstrează într-un vas închis, la 4°C.

---

[1] Gurvici A. E., Kuzovleva O. B. i Tumanova A. E., Biohimiia, 1961, **26**, 934.

* Coons A. H., Leduc E. H. a. Connoly J. M., J. Exp. Med., 1955, **102**, 49.

Scanned with OKEN Scanner

ERATĂ

Pag.	rîndul	în loc de:	se va citi:
226	fig. 58 *a*	Volumul eluantului (ml)	Volumul eluantului (ml) × 5
226	1 de jos	ţinînd 0,1 M NaCl.	ţinînd 0,1 M NaCl (după P. Fireman şi colab., 1963).
227	fig. 59	Volumul eluantului (ml)	Volumul eluantului (ml) × 2,5

Analiza imunochimică Bucureşti, 1966.

Redactor responsabil : OFELIA BUŞILĂ
Tehnoredactor : CORA JOHNSON

Dat la cules 02.07.1966. Bun de tipar 15.11.1966. Apărut 1966. Tiraj 1700 ex. Hîrtie velină de 80 g/m² 16/700×1000 Coli editoriale 28,97. Coli de tipar 23. Panşe tipo 13, A 7305/966. C.Z. pentru biblioteci mari 576.8.097.093. C.Z. pentru biblioteci mici 576.8

Intreprinderea poligrafică „Informaţia" str. Brezoianu nr. 23—25. Bucureşti, Republica Socialistă România.
Comanda nr. 230

ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
au mai apărut:

C. **BODEA** ș.a., *Tratat de biochimie vegetală*, partea I, *Fitochimie*, vol. I, 1964, 1—746 p., 41 lei; vol. II, 1965, 747—2008 p., 56 lei; vol. III, 1966, 2009—2783 p., 35 lei;

TIBERIU NĂSCUȚIU, *Cromatografia pe hîrtie a substanțelor anorganice*, 1961, 319 p., 13,90 lei;

ST. S. NICOLAU și **N. CONSTANTINESCU**, *Rickettsii și rickettsioze*, 1965, 803 p., 56 lei;

R. PORTOCALĂ și **N. I. IONESCU**, *Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie*, 1962, 180 p., 9,90 lei;

D. PURDELA și **V. VÎLCEANU**, *Chimia compușilor organici ai fosforului și ai acizilor lui*, 1965, 540 p., 37 lei;

O. VLĂDUȚIU, *Patologia chirurgicală a animalelor domestice*, vol. I, 1962, 813 p., 74 lei; vol. II, 1966;

ILIE VASILESCU, *Enzimele*, 1961, 429 p., 22,80 lei.

Vor apărea:

C. **BODEA** ș.a., *Tratat de biochimie vegetală*, Partea I, *Fitochimie*, vol. IV;

C. **CISMARU** și **F. SEGAL**, *Cinetica reacțiilor în medii solide;*

E. **CRĂCIUN** și **SMARANDA CONSTANTINESCU**, *Culturi de țesuturi în biologia experimentală;*

I. G. **MURGULESCU** și **V. E. SAHINI**, Atomi. Legătura chimică. Structura moleculară.

Scanned with OKEN Scanner